

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A REDAÇÃO FINAL DA
TESE DEFENDIDA POR André Gustavo de
Sousa Galdino..... E APROVADA
PELA COMISSÃO JULGADORA EM 24 / 05 / 2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA
COMISSÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
MECÂNICA

André Gustavo de Sousa Galdino

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
ARCABOUÇOS POROSOS DE
COMPÓSITOS HIDROXIAPATITA-
TITÂNIA (HA-TiO₂) PARA USO EM
ENGENHARIA TECIDUAL ÓSSEA**

Campinas, 2011

André Gustavo de Sousa Galdino

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ARCABOUÇOS POROSOS DE COMPÓSITOS HIDROXIAPATITA- TITÂNIA (HA-TiO₂) PARA USO EM ENGENHARIA TECIDUAL ÓSSEA

Tese apresentada ao Curso de Doutorado da Faculdade de Engenharia Mecânica da Universidade Estadual de Campinas, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Mecânica.

Área de concentração: Engenharia de Materiais

Orientadora: Prof. Dra. Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia

Campinas
2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

G131p Galdino, André Gustavo de Sousa
Produção e caracterização de arcabouços porosos de
compósitos hidroxiapatita-titânia (HA-TiO₂) para uso em
engenharia tecidual óssea / André Gustavo de Sousa
Galdino. --Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia.
Tese de Doutorado - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica.

1. Compósitos de matriz cerâmica. 2. Engenharia
tecidual. 3. Hidroxiapatita. 4. Dióxido de titânio. 5.
Porosidade. I. Zavaglia, Cecília Amélia de Carvalho. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia Mecânica. III. Título.

Título em Inglês: Production and characterization of hydroxyapatite-titanium
oxide scaffolds for bone tissue engineering

Palavras-chave em Inglês: Ceramic matrix composites, Tissue engineering,
Hydroxyapatite, Titanium dioxide, Porosity

Área de concentração: Materiais e Processos de Fabricação

Titulação: Doutor em Engenharia Mecânica

Banca examinadora: Célia Marina de Alvarenga Freire, Maria Clara Filippini
Ierardi, Marcelo Henrique Prado da Silva, Eliana Cristina da
Silva Rigo

Data da defesa: 24/05/2011

Programa de Pós Graduação: Engenharia Mecânica

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA
COMISSÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA MECÂNICA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE MATERIAIS

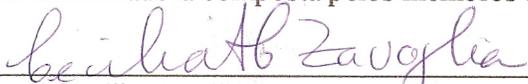
TESE DE DOUTORADO

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
ARCABOUÇOS POROSOS DE COMPÓSITOS
HIDROXIAPATITA-TITÂNIA (HA-TiO₂)
PARA USO EM ENGENHARIA TECIDUAL
ÓSSEA**

Autor: André Gustavo de Sousa Galdino

Orientadora: Cecília Amélia Carvalho Zavaglia

A banca examinadora composta pelos membros abaixo aprovou esta Tese:



Prof. Dra. Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia
DEMA - FEM – UNICAMP



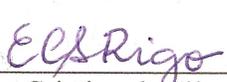
Prof. Dra. Célia Marina de Alvarenga Freire
DEMA - FEM – UNICAMP



Prof. Dra. Maria Clara Filippini Ierardi
DEMA - FEM – UNICAMP



Prof. Dr. Marcelo Henrique Prado da Silva
Seção de Engenharia Mecânica e de Materiais - IME



Prof. Dra. Eliana Cristina da Silva Rigo
Departamento de Ciências Básicas – FZEA/USP/Pirassununga

Campinas, 24 de maio de 2011

Dedico este trabalho ao meu filho Gabriel e aos meus pais. Sem o amor e carinho destes, minha jornada até este ponto não seria possível.

Agradecimentos

Este trabalho só foi realizado devido à ajuda de várias pessoas, a quem gostaria gentilmente de agradecer:

A DEUS, por me acompanhar em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais e minhas irmãs, pelas palavras de incentivo e apoio quando as dificuldades pareciam intransponíveis.

À minha orientadora Prof. Dra. Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia, por acreditar no meu potencial, pelas palavras de incentivo, pela ajuda e orientação ao longo do trabalho.

À Prof. Dra. Ana Campa, da USP, e aos seus alunos de pós-graduação Fabíola Branco Filippin Monteiro e Edson Mendes, pela realização dos ensaios *in vitro* desta tese.

Ao Prof. Dr. Rubens Caram Junior, pela realização dos ensaios mecânicos de compressão.

Aos técnicos de laboratório Sr. José Luis Lisboa e Claudenete Vieira Leal, sem os quais os ensaios de caracterização não teriam sido realizados.

À Prof. Dra. Carmen Gilda Barroso Tavares Dias, pela realização dos ensaios e comentários pertinentes sobre os resultados de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier.

Ao CNPq, pela bolsa de doutorado e taxa de bancada.

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – BIOFABRIS pelo apoio técnico-financeiro para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Luciano Gobbo, da Panalytical, pela análise do refinamento de Rietveld.

A todos os meus amigos, em especial Beethoven Max, Mônica Oliveira, Sabrina Sayori Okada, Alan Menezes, Fábio Gatamorta e Fabiano Mucillo, pela força e incentivo nos momentos mais difíceis da tese.

Aos funcionários da FEM/Unicamp, em especial a Srta. Ana Carolina Capellini e o Sr. Jonas Roberto da Cunha;

A todos que de alguma forma me ajudaram e por algum motivo não foram citados aqui, meu muito obrigado.

Resumo

À medida que há uma melhoria na tecnologia aplicada à saúde humana, a expectativa de vida vem aumentando, mas nem todas as partes do corpo podem manter suas funções com o processo de envelhecimento. É preciso que os ossos e a cartilagem apóiem o envelhecimento do corpo, embora as células que os produzem se tornem menos ativas com o tempo. Outros órgãos, tais como os rins, o coração e o fígado devem ser operados para ter um tempo de vida maior. A engenharia tecidual foi desenvolvida para substituir, reparar ou reconstruir tecidos ou órgãos perdidos ou danificados por acidentes ou doenças graves através da utilização e desenvolvimento de novos materiais, que sejam biocompatíveis, bioabsorvíveis, porosos, entre outras características. Os *scaffolds* são arcabouços tridimensionais porosos e são utilizados na regeneração de tecidos para seu estado natural e suas funções, que é fundamental para a engenharia tecidual. Eles podem ser classificados em arcabouços que induzem a migração e o crescimento celular e em arcabouços carreadores de células osteogênicas autógenas, que foram colonizadas em biorreatores e subsequentemente reimplantadas no paciente. Tais *scaffolds* podem ser naturais ou sintéticos.

O objetivo deste trabalho é avaliar o compósito poroso de hidroxiapatita – titânia (HA-TiO₂), em três composições diferentes (50% HA – 50% TiO₂, 60% HA – 40% TiO₂, 70% HA – 30% TiO₂) para obter *scaffolds* utilizados para engenharia tecidual óssea. Os corpos de prova foram produzidos pelo método da esponja polimérica, utilizando bicarbonato de sódio como ligante e floculante. A sinterização foi realizada em três temperaturas: a 1250°C; 1300°C e 1350°C. As propriedades analisadas foram: resistência à compressão e dureza através das normas da ASTM, porosidade aparente, densidade aparente, retração linear de queima e absorção de água, pelo método de Souza Santos para argilas.

Os resultados obtidos mostraram-se bastante satisfatórios, onde foi mostrado que os corpos cerâmicos porosos obtiveram valores de resistência à compressão e dureza coerentes com os da literatura e superiores aos da hidroxiapatita pura. Realizou-se também uma caracterização estrutural das amostras via difração de raios – x (DRX), microscopia eletrônica de varredura

(MEV) e espectroscopia por infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR). Com base nos resultados mecânicos e de caracterização estrutural, foi escolhida a amostra com composição de 50% HA – 50% TiO₂ sinterizada a 1350°C para realização de ensaios *in vitro*, onde foram avaliadas citotoxicidade e crescimento celular de osteoblastos e fibroblastos de camundongos. Os resultados indicaram que o compósito é biocompatível e que as células cresceram nos *scaffolds*.

De forma geral, pode-se concluir que todas as amostras são indicadas para a utilização como matéria prima para aplicação em engenharia tecidual óssea. A amostra com 50% HA – 50% TiO₂ apresentou melhores características para a realização dos ensaios *in vitro* realizados neste trabalho e pode-se indicar esta para a realização de ensaios *in vivo*, onde devem ser avaliadas as características de citotoxicidade e crescimento de células ósseas em animais, por um período de 15 e 30 dias, conforme normas da área de saúde.

Palavras Chave: Compósitos de matriz cerâmica; Engenharia tecidual; Hidroxiapatita; Dióxido de titânio; Porosidade.

Abstract

As we witness an improvement in the technology applied to human health, life expectancy increases, even though not every part of the body can maintain their functions with the aging process. It is necessary that bones and cartilage support the body's aging, even if the cells that produce them become less active with time. Other organs, such as kidneys, heart and liver must be operated to have a higher lifetime. Tissue engineering has been developed in order to replace, repair or rebuild tissues or organs lost or damaged due to accidents or serious diseases through the use and development of new materials that are biocompatible, bioabsorbable, with porosity among other characteristics. Scaffolds are a kind of porous tridimensional net and they are used on tissues regeneration to their natural state and functions, which is fundamental for tissue engineering. They can be classified as scaffolds that induce migration and cell growth and as carrier scaffolds for autogenous osteogenic cells, which were colonized inside bioreactors and then redeployed on the patient. Those scaffolds can be natural or synthetic.

This research aimed to evaluate hydroxyapatite-titanium oxide (HA-TiO₂) with three different compositions (50% HA – 50% TiO₂, 60% HA – 40% TiO₂, 70% HA – 30% TiO₂) to obtain scaffolds used for bone tissue engineering. Samples were made by the polymeric sponge method, using sodium bicarbonate as a binder and flocculating agent. Sintering was carried out at 1250°C; 1300°C e 1350°C. It was analyzed compressive strength and Vickers hardness using ASTM Standards, apparent porosity, apparent density, burning linear retraction and water absorption by Souza Santos method used for clays.

Results proved satisfactory showing that ceramic bodies obtained compressive strength and Vickers hardness according to literature and higher than those for pure hydroxyapatite. Samples structural characterization was done by x-ray diffraction (XRD), scanning electronic microscopy (SEM) and Fourier transformed infrared (FT-IR). It was chosen 50% HA – 50% TiO₂ sintered at 1350°C based on its mechanical properties and structural characterization and *in vitro* essays were done to evaluate citotoxicity and mouse osteoblasts and fibroblasts cell growth.

Results have shown that the composite is biocompatible and the cell growth above scaffolds surface.

In general, samples can be recommended for use as raw material for bone tissue engineering application. The sample with 50% HA – 50% TiO₂ showed better characteristics for *in vitro* essays done and it can be recommended for *in vivo* essays where citotoxicity and bone cell growth in animals during 15 and 30 days, according to health standards.

Key words: Ceramic matrix composites; Tissue engineering; Hydroxyapatite; Titanium dioxide; Porosity.

Lista de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 2.1 – Esquema do transporte de material fase vapor | 33 |
| Figura 2.2 – Efeito da densidade a verde na densidade final e tamanho de grão para alumina contendo 0,25% em massa de MgO | 35 |
| Figura 2.3 – Intervalos de temperatura de transformação para óxidos de alumínio | 36 |
| Figura 2.4 – Adsorção e dessorção criogênica de nitrogênio em um pó de alumina a 77,4 K | 43 |
| Figura 2.5 – Ilustração esquemática da razão e definição da área sólida mínima (MSA) | 51 |
| Figura 3.1 – Difratoograma de raios X da hidroxiapatita como recebida | 62 |
| Figura 3.2 – Difratoograma de raios X para a titânia como recebida | 64 |
| Figura 3.3 – Distribuição e forma dos poros para a esponja comercial de poliuretano | 65 |
| Figura 3.4 – Fluxograma detalhado da etapa de confecção dos corpos de prova | 70 |
| Figura 3.5 – Fluxograma detalhado da etapa de caracterização estrutural dos corpos de prova | 70 |
| Figura 3.6 – Fluxograma detalhado da etapa de ensaios físicos | 71 |
| Figura 3.7 – Fluxograma detalhado da etapa de ensaios mecânicos | 71 |
| Figura 3.8 – Fluxograma detalhado da etapa de ensaios <i>in vitro</i> | 72 |
| Figura 4.1 – Micrografia da amostra A sinterizada a 1250°C | 74 |
| Figura 4.2 – Espectroscopia de raios X por dispersão de energia para a amostra A sinterizada a 1250°C | 75 |
| Figura 4.3 – Difratoograma de raios X para a amostra A sinterizada a 1250°C | 76 |
| Figura 4.4 – Micrografias da amostra A sinterizada a 1300°C | 77 |
| Figura 4.5 – Espectroscopia de raios X por dispersão de energia para a amostra A sinterizada a 1300°C | 77 |
| Figura 4.6 – Difratoograma de raios X para a amostra A sinterizada a 1300°C | 79 |
| Figura 4.7 – Micrografias da amostra A sinterizada a 1350°C | 79 |
| Figura 4.8 – Espectroscopia de raios X por dispersão de energia para a amostra A sinterizada a 1300°C | 80 |

| | |
|---|----|
| Figura 4.9 – Difratoograma de raios X para a amostra A sinterizada a 1350°C | 81 |
| Figura 4.10 – Micrografias da amostra B sinterizada a 1250°C | 82 |
| Figura 4.11 – Espectroscopia de raios X por dispersão de energia para a amostra B sinterizada a 1250°C | 82 |
| Figura 4.12 – Difratoograma de raios X para a amostra B sinterizada a 1250°C | 83 |
| Figura 4.13 – Micrografias da amostra B sinterizada a 1300°C | 84 |
| Figura 4.14 – Espectroscopia de raios X por dispersão de energia para a amostra B sinterizada a 1300°C | 84 |
| Figura 4.15 – Difratoograma de raios X para a amostra B sinterizada a 1300°C | 85 |
| Figura 4.16 – Micrografias da amostra A sinterizada a 1350°C | 86 |
| Figura 4.17 – Espectroscopia de raios X por dispersão de energia para a amostra B sinterizada a 1300°C | 87 |
| Figura 4.18 – Difratoograma de raios X para a amostra A sinterizada a 1350°C | 88 |
| Figura 4.19 – Micrografias da amostra C sinterizada a 1250°C | 90 |
| Figura 4.20 – Espectroscopia de raios X por dispersão de energia para a amostra C sinterizada a 1250°C | 90 |
| Figura 4.21 – Difratoograma de raios X para a amostra C sinterizada a 1250°C | 91 |
| Figura 4.22 – Micrografias da amostra C sinterizada a 1300°C | 92 |
| Figura 4.23 – Espectroscopia de raios X por dispersão de energia para a amostra C sinterizada a 1300°C | 93 |
| Figura 4.24 – Difratoograma de raios X para a amostra C sinterizada a 1300°C | 94 |
| Figura 4.25 – Micrografias da amostra C sinterizada a 1350°C | 94 |
| Figura 4.26 – Espectroscopia de raios X por dispersão de energia para a amostra C sinterizada a 1300°C | 95 |
| Figura 4.27 – Difratoograma de raios X para a amostra C sinterizada a 1350°C | 96 |
| Figura 4.28 – Resultados de FT-IR para a hidroxiapatita pura | 97 |
| Figura 4.29 - Resultados de FT-IR para a titânia | 97 |
| Figura 4.30 – Resultados para as três composições sinterizadas a 1350°C | 98 |
| Figura 4.31 - Ensaio de viabilidade celular frente a compósitos cerâmicos pelo método de redução de MTT. Linhagens de fibroblastos (3T3 L1) e osteoblasto (OFCOL II) de camundongos foram incubadas na presença dos compósitos durante cinco dias a 37°C em estufa de CO ₂ . Os | |

compósitos foram lavados e em seguida o reagente de MTT foi adicionado. Nos poços superiores os compósitos não foram incubados com células (controle negativo) e nos poços inferiores as células foram adicionadas. Nos poços inferiores os pontos escuros referem-se aos grupos de células aderidas ao compósito

102

Figura 4.32 – Solubilização dos cristais de formazan por DMSO. O solvente DMSO foi adicionado aos compósitos testados para a dissolução dos cristais de formazan formados internamente às células. Nos compósitos controle não foi observado a alteração de coloração da solução, devido a ausência de células viáveis. Já nos compósitos testes, verificou-se uma intensa coloração roxa, demonstrando a presença de células viáveis aderidas ao material

103

Figura 4.33 – Ensaio de proliferação da linhagem de fibroblastos NIH-3T3 de camundongos no compósito A sinterizado a 1350°C. As células foram incubadas a 37°C em estufa de CO₂ na presença dos compósitos e a cada intervalo de tempo de 24 horas, um compósito foi retirado o método de redução de MTT e a dissolução dos cristais de formazan foi realizada. A solução final de coloração roxa foi medida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 490 nm. O resultado da curva mostrou-se linear com uma regressão de $R^2 = 0,98952$. Os resultados foram expressos pela média e desvio padrão de três ensaios distintos

104

Figura 4.34 – Proliferação de osteoblastos OFCOL II no compósito A sinterizado a 1350°C. As células foram incubadas à 37°C em estufa de CO₂ na presença dos compósitos e a cada intervalo de tempo de 24 horas, um compósito foi retirado o método de redução de MTT e a dissolução dos cristais de formazan foram realizados. A solução final de coloração roxa foi medida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 490 nm. O resultado da curva mostrou-se linear com uma regressão de $R^2 = 0,97612$. Os resultados foram expressos pela média e desvio padrão de três ensaios distintos

104

Figura 4.35 – Comparação da proliferação de fibroblastos NIH-3T3 e osteoblastos OFCOL II no compósito A sinterizado a 1350°C. As células foram incubadas à 37°C em estufa de CO₂ na presença dos compósitos e a cada intervalo de tempo de 24 horas, um compósito foi retirado o método de redução de MTT e a dissolução dos cristais de formazan foram realizados. A solução final de coloração roxa foi medida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 490 nm. Nota-se uma maior absorbância nos fibroblastos em comparação aos osteoblastos. Os resultados foram expressos pela média e desvio padrão de três ensaios distintos

105

Figura 4.36 – Micrografia eletrônica de varredura indicando o crescimento das células NIH-3T3. (a) visão geral do compósito poroso; (b) visão do formato e tamanho dos poros do compósito poroso; (c) e (d) células NIH-3T3 crescendo nos poros após cinco dias de incubação 106

Figura 4.37 – Micrografia eletrônica de varredura indicando o crescimento das células OFCOL II. (a) visão geral do compósito poroso; (b) visão do formato e tamanho dos poros do compósito poroso; (c) e (d) células OFCOL II crescendo nos poros após cinco dias de incubação 108

Lista de Tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 2.1 – Valores dos índices de zona (IZ) | 16 |
| Tabela 2.2 – Valores dos índices de lise (IL) | 17 |
| Tabela 2.3 – Graus de reatividade para o ensaio de eluição | 19 |
| Tabela 2.4 – Mecanismos de sinterização | 33 |
| Tabela 2.5 – Efeito dos componentes químicos na perda de área superficial específica na alumina | 37 |
| Tabela 2.6 – Hierarquia das categorias de dependência da porosidade por parte das propriedades | 45 |
| Tabela 3.1 – Resultados de fluorescência de raios X da hidroxiapatita, como recebida | 62 |
| Tabela 3.2 – Resultados de fluorescência de raios X para a titânia, como recebida | 63 |
| Tabela 4.1 – Distribuições percentuais em massa dos elementos químicos presentes na amostra A sinterizada a 1250°C | 75 |
| Tabela 4.2 – Distribuições percentuais em massa dos elementos químicos presentes na amostra A sinterizada a 1300°C | 78 |
| Tabela 4.3 – Distribuições percentuais em massa dos elementos químicos presentes na amostra A sinterizada a 1350°C | 80 |
| Tabela 4.4 – Distribuições percentuais em massa dos elementos químicos presentes na amostra B sinterizada a 1250°C | 83 |
| Tabela 4.5 – Distribuições percentuais em massa dos elementos químicos presentes na amostra B sinterizada a 1300°C | 85 |
| Tabela 4.6 – Distribuições percentuais em massa dos elementos químicos presentes na amostra B sinterizada a 1350°C | 87 |
| Tabela 4.7 – Distribuições percentuais em massa dos elementos químicos presentes na amostra C sinterizada a 1250°C | 90 |
| Tabela 4.8 – Distribuições percentuais em massa dos elementos químicos presentes na amostra C sinterizada a 1300°C | 85 |

| | |
|--|-----|
| Tabela 4.9 – Distribuições percentuais em massa dos elementos químicos presentes na amostra C sinterizada a 1350°C | 87 |
| Tabela 4.10 – Distribuições percentuais em massa dos elementos químicos presentes na amostra C sinterizada a 1250°C | 91 |
| Tabela 4.11 – Distribuições percentuais em massa dos elementos químicos presentes na amostra C sinterizada a 1300°C | 93 |
| Tabela 4.12 – Distribuições percentuais em massa dos elementos químicos presentes na amostra C sinterizada a 1350°C | 95 |
| Tabela 4.13 – Resultados dos refinamentos de Rietveld para as composições A, B e C a 1250°C, 1300°C e 1350°C | 97 |
| Tabela 4.14 – Resultados dos ensaios físicos para as amostras A, B e C, após sinterização a 1250°C, 1300°C e 1350°C | 100 |
| Tabela 4.15 – Resultados do ensaio de compressão e dureza para as amostras A, B e C, sinterizadas a 1250°C, 1300°C e 1350°C | 102 |

Lista de Equações

| | |
|-------------|----|
| Equação 2.1 | 16 |
| Equação 2.2 | 39 |
| Equação 2.3 | 40 |
| Equação 2.4 | 41 |
| Equação 2.5 | 41 |
| Equação 2.6 | 41 |
| Equação 2.7 | 42 |
| Equação 2.8 | 46 |
| Equação 2.9 | 55 |
| Equação 3.1 | 67 |
| Equação 3.2 | 67 |
| Equação 3.3 | 67 |
| Equação 3.4 | 67 |
| Equação 3.5 | 67 |

Lista de Abreviaturas e Siglas

Letras Latinas

| | |
|------------------------------------|-------------------|
| D – distribuição | |
| p – porosidade | [%] |
| V – volume | [m ³] |
| P – pressão | [Pa] |
| r – raio do poro | [m] |
| S – área específica de poro | [m ²] |
| X – propriedade do corpo | |

Letras Gregas

| | |
|---|------|
| θ – ângulo de contato do mercúrio com as paredes do poro | [°] |
| γ - tensão e superfície | [Pa] |
| σ - tensão de falha | [Pa] |

Superescritos

n – índice para equação de porosidade

Subscritos

S – sólidos;

V – volume;

v – vazios.

Abreviações

AA – Absorção de água;

DA – Densidade aparente;

DRX – Difração de raios – x;

DMEM – Dulbecco's modified Eagle's médium;

DMSO – Dimetilsulfóxido;

EDS – Espectroscopia de raios X por dispersão de energia;

FRX – Fluorescência de raios – x;

FT-IR – Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier;

HA – Hidroxiapatita;

HV – Dureza Vickers;

IL – Índice de lise;

IR – Índice de resposta;

IZ – Índice de zona;

LRC – Limite de resistência à compressão;

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura;

MTT – Brometo de (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio);

PA – Porosidade aparente;

PBS – Solução tampão fosfato;

PEAD – Polietileno de alta densidade;

PS – Poliestireno;

PU – Poliuretano;

PVC – Poli (cloreto de vinila);

RQ – Retração linear de queima;

SFB – Soro fetal bovino;

Siglas

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas;

ASTM - American Society for Testing and Materials;

DEMA - Departamento de Engenharia de Materiais;

FCF – Faculdade de Ciências Farmacêuticas;

FEM – Faculdade de Engenharia Mecânica;

LABIOMECH – Laboratório de Biomecânica;

UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas;

USP – Universidade de São Paulo;

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. REVISÃO DA LITERATURA | 3 |
| 2.1. Aplicações dos Biomateriais | 4 |
| 2.2. Biocompatibilidade e Biofuncionalidade | 5 |
| 2.3. Classificação dos Biomateriais | 6 |
| 2.4. Biomateriais Cerâmicos | 8 |
| 2.4.1. Hidroxiapatita | 9 |
| 2.4.2. Titânia | 10 |
| 2.5. Ensaaios em biomateriais | 11 |
| 2.5.1. Características que devem ser avaliadas para biomateriais | 12 |
| 2.5.2. Métodos de ensaios <i>in vitro</i> | 15 |
| 2.5.2.1. Ensaio do contato direto (ASTM F813) | 15 |
| 2.5.2.2. Ensaio de difusão em Agar (ASTM F-895) | 17 |
| 2.5.2.3. Ensaio de Eluição (USP 23) | 18 |
| 2.5.3. Comparação entre ensaios <i>in vitro</i> | 19 |
| 2.5.4. Métodos de ensaios <i>in vivo</i> | 20 |
| 2.5.4.1. Generalidades sobre o implante e o tecido vivo | 21 |
| 2.6. Processos de fabricação de corpos porosos | 23 |
| 2.6.1. Método da esponja polimérica | 24 |
| 2.6.2. Método espumante | 28 |
| 2.6.3. Método da adição de cera | 29 |
| 2.7. Porosidade | 30 |
| 2.8. A origem da porosidade | 31 |
| 2.9. Sinterização | 31 |
| 2.9.1. Efeito do tamanho e forma da partícula | 34 |
| 2.9.2. Efeito da densidade a verde | 34 |
| 2.9.3. Efeito dos aditivos | 35 |

| | |
|---|-----|
| 2.9.4. Efeito da temperatura | 37 |
| 2.10. Cálculo da porosidade | 38 |
| 2.11. Porosidade aberta | 40 |
| 2.11.1. Técnicas de caracterização de cerâmicas porosas | 40 |
| 2.11. 1.1. Porosimetria por mercúrio | 40 |
| 2.11.1.2. Sorção de gás | 42 |
| 2.12. Porosidade fechada | 44 |
| 2.13. Hierarquia dos impactos da porosidade nas propriedades | 45 |
| 2.14. Modelos básicos de aproximações para propriedades mecânicas | 48 |
| 2.14.1. Modelos baseados na tensão | 48 |
| 2.14.2. Modelos da área sólida mínima | 50 |
| 2.15. Modelagem dos efeitos da porosidade e micro-trinca nas propriedades físicas | 52 |
| 2.16. Aproximações estatísticas para materiais frágeis | 53 |
| 2.16.1. Distribuições de Weibull | 54 |
| 2.16.2. Fatores que afetam o módulo de Weibull | 56 |
| 2.17. Engenharia tecidual | 56 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 62 |
| 3.1. Materiais | 62 |
| 3.2. Métodos | 66 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES | 74 |
| 4.1. Ensaio de caracterização estrutural, físicos e mecânicos | 74 |
| 4.2. Ensaio <i>in vitro</i> | 103 |
| 5 CONCLUSÕES | 113 |
| 6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS | 116 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 117 |

1. INTRODUÇÃO

Os biomateriais cerâmicos são cada vez mais importantes na clínica médica para a regeneração do tecido ósseo e, mais recentemente, vem sendo utilizados como carreadores de células nas terapias celulares (CARSON; BOSTROM, 2007).

Um grande desafio da pesquisa atual reside em produzir biomateriais comerciais com características físico-químicas e morfológicas que estimulem a osteogênese. Dessa forma, propicia-se a formação de estruturas semelhantes aos elementos de matriz extracelular, facilitando a mobilização, expansão e integração de populações de células regenerativas, fomentando o reparo de lesões ou a renovação de tecidos degenerados.

Os biomateriais substitutos ósseos podem ser de origem natural ou sintética. A vantagem da utilização de materiais de origem natural – tais como enxertos de origem bovina – deve-se à estrutura biológica única, não reprodutível nos materiais de origem sintética. Destaca-se ainda que os enxertos inorgânicos (livres de proteínas ou outros resíduos orgânicos) apresentam-se como um excelente material osteocondutor quando adequadamente processados.

A presença dos íons de carbonatos na estrutura da apatita dos xenoenxertos atribui a estes biomateriais uma biodegradabilidade não usualmente encontrada nos equivalentes sintéticos. Junto a isto, deve-se considerar outra qualidade dos xenoenxertos: seu processamento adequado possibilita reproduzir com fidelidade a morfologia natural do osso humano.

Dentre os materiais sintéticos utilizados, a hidroxiapatita (fosfato de cálcio - $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})$) é o mais utilizado, por ser idêntico à parte mineral encontrada dos ossos, sendo aplicável para engenharia do tecido ósseo. Porém, este material possui resposta fraca sob tensão mecânica. A hidroxiapatita foi usada inicialmente como pó, em pequenos implantes sem carga, revestimentos de implantes metálicos, implantes porosos para crescimento ósseo. Pode facilmente ser degradada se as condições forem favoráveis (pH, ataque químico,

fagocitose). Devido à baixa resposta sob tensão mecânica da hidroxiapatita, vários compósitos têm sido desenvolvidos a fim de aumentar a resposta quando submetidos a tensões mecânicas.

Este trabalho tem por objetivo avaliar o compósito poroso de hidroxiapatita – titânia (HA-TiO₂), confeccionado pelo método da esponja polimérica, na obtenção de *scaffolds* para engenharia tecidual óssea. Para tanto, o trabalho foi dividido em três etapas:

- 1) Caracterização estrutural, onde foi avaliada a integridade dos compósitos porosos via Microscopia Eletrônica de Varredura, Difração de raios X e Espectroscopia de raios X por dispersão de energia;
- 2) Caracterização física e mecânica, onde foi avaliada a distribuição de porosidade, grau de sinterização, porosidade aparente, absorção de água e retração linear de queima, além da resistência à compressão e dureza das amostras;
- 3) Ensaio *in vitro*, onde se avaliou toxicidade e crescimento de células nos suportes porosos de HA-TiO₂.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Desde o princípio da humanidade o homem tem procurado restaurar ou substituir partes danificadas do corpo humano. Inicialmente, por falta de outra alternativa, os especialistas médicos amputavam o membro que se encontrava enfermo, o que, na prática, salvava vidas em um bom número de casos, porém a qualidade de vida dos pacientes não ficava satisfatória (SASTRE *et al.*, 2004). Havia a preocupação em substituir o tecido ósseo humano, sendo que em meados do século XVII, Fallopius (ACIDUMAN e BELEN, 2007) implantou uma placa de ouro para restaurar um defeito craniano, e desde então se tem usado os implantes para a substituição de partes danificadas do sistema ósseo. Há cerca de quase duas décadas, com o advento de novas tecnologias e desenvolvimento da pesquisa, a área de biomateriais vem se tornando mais forte, com uso de vários materiais, passando por cerâmicas (alumina, zircônia, titânia, hidroxiapatita, etc.), polímeros (polietileno de ultra-alto peso molecular, etc.), compósitos, etc. Mais recentemente, as células-tronco e “scaffolds” têm sido alvo de estudo, e são consideradas como o futuro dos biomateriais.

Biomateriais podem ser definidos como sendo uma substância ou uma mistura de substâncias, de origem natural ou sintética, que são toleradas de forma provisória ou permanente pelos diversos tecidos que constituem os órgãos dos seres vivos. Eles podem ser utilizados como um todo ou parte de um sistema que trata, com o objetivo de restaurar ou substituir algum tecido, órgão ou função do corpo (MIRTCHI *et al.*, 1989), ou ainda como um material não biológico utilizado em um dispositivo médico, com intenção de interagir com sistemas biológicos (WILLIAMS, 1987).

Para que um material seja classificado como um biomaterial, ele precisa atender a determinados critérios. Para a Conferência de Consenso em Biomateriais em aplicações clínicas de 1982, entende-se por biomaterial (WILLIAMS, 1987): “Toda substância (com exceção de drogas) ou combinação de substâncias, de origem sintética ou natural, que durante um período de tempo indeterminado é empregado como um todo ou parte integrante de um sistema para tratamento, ampliação ou substituição de quaisquer tecidos, órgãos ou funções corporais”. Isso significa que, no sentido mais amplo, são enquadrados

nessa categoria todos os materiais empregados na medicina, odontologia, medicina veterinária e farmacologia (que não sejam drogas), além daqueles que entram na forma de implantes em contato direto com o tecido do corpo (SANTOS, 2002). Park (1992) dá uma definição mais prática, onde "biomateriais são todas os materiais que, de modo contínuo ou intermitente, entram em contato com fluidos corpóreos, mesmo que esteja localizado fora do corpo". Assim, por esta definição, pinos e placas de fixação externas não são considerados biomateriais, desde que estes não entrem em contato com qualquer tipo de fluido, enquanto que bisturis, lâminas e demais instrumentos cirúrgicos, o são. Alguns exemplos de biomateriais são próteses, implantes, lentes de contato e marcapassos.

Ciências como a nanotecnologia, engenharia tecidual e engenharia de materiais, têm desenvolvido, em conjunto, importantes avanços no ramo dos biomateriais. O processo de fabricação dos biomateriais engloba várias etapas importantes: a) seleção de material, onde existe uma vasta gama de opção, tendo em conta que podem ser utilizados metais puros ou ligas metálicas, materiais cerâmicos, compósitos, tecidos ou malhas de poliéster e polímeros de natureza variada; b) análise de quantidades (onde a medição e cotagem são fundamentais); c) possíveis reações no organismo (onde se requer uma cuidadosa análise química, fisiológica e mecânica da relação biomaterial-organismo). Estas etapas são desenvolvidas por cada ciência, onde o papel de cada uma tem uma importância crucial. Para que um biomaterial tenha bom resultado, necessita-se ter um processo, todo ele meticoloso, para que o resultado seja o esperado e conseqüentemente para que o consumidor fique satisfeito. Entretanto, tudo isto implica grandes gastos econômicos, o que faz com que países mais desenvolvidos tenham maior capacidade de investir e, conseqüentemente, onde existe uma maior taxa de aplicações.

2.1. Aplicações dos Biomateriais

Os principais avanços no campo dos biomateriais têm ocorrido principalmente devido ao aumento do número de pacientes, em função do aumento da população e da expectativa de vida, que necessitam obter melhoria na qualidade de vida. O crescimento da expectativa de vida aumenta o número de pacientes nos hospitais como conseqüência principalmente da

ocorrência de osteoporose e de acidentes nos meios de transporte. Além disso, a ampliação do número de pacientes nos hospitais está diretamente correlacionada à proliferação de veículos de transporte, gerando aumento no número de acidentes com lesões graves. Também o desenvolvimento das técnicas cirúrgicas tem expandido a demanda por próteses, implantes e equipamentos médicos.

Os biomateriais são uma parte importante dos cerca de 300.000 produtos para uso na área da saúde. Em 2000, o mercado mundial de biomateriais foi estimado em 23 bilhões de dólares, com taxa de crescimento de 12% ao ano, o que significaria já ter, em 2005, ultrapassado os US\$ 40 bilhões. A participação dos EUA se situa entre 35-45% do mercado mundial, enquanto o mercado europeu é responsável por cerca de 25%. Somente o mercado músculo-esquelético foi estimado em 24 bilhões de dólares em 2005, com US\$13,3 bilhões correspondendo ao mercado norte-americano (SOARES, 2005).

Os setores mais privilegiados nesta área são:

1. Cardiologia: com cerca de 56 a 80% dos gastos, em equipamentos e utensílios como cardioversores, cardiodesfibriladores, marcapassos, catéteres, próteses endovasculares e válvulas cardíacas;
2. Ortopedia: com gastos a volta dos 20 a 36% em próteses de quadril, joelho e ombro, implantes de coluna, parafusos bioabsorvíveis, cimentos ortopédicos e implantes neurológicos; a terapia renal com equipamentos de hemodiálise;
3. Oftalmologia: em lentes intraoculares; otorrinolaringologia, com próteses auditivas.

Nos últimos anos tem se dado um crescimento considerável nas aplicações músculo-esquelético, isto é, no estudo de materiais bioativos que favorecem e facilitam o crescimento de osso e/ou cartilagens em áreas lesadas (SOARES, 2005).

2.2. Biocompatibilidade e Biofuncionalidade

Segundo Santos (SANTOS, 2002; ZAVAGLIA, 1993), “biocompatibilidade significa que o material e seus possíveis produtos de degradação devem ser tolerados pelos tecidos

envoltórios e não devem causar prejuízos ao organismo a curto e longo prazo”. Para que um material seja aceito clinicamente como um material de implante, ele precisa atender a alguns requisitos fundamentais (ZAVAGLIA, 1993):

- O material deve ser biocompatível, ou seja, sua presença não deve causar efeitos nocivos no local do implante ou no sistema biológico;
- Os tecidos não devem causar a degradação do material, como, por exemplo, corrosão em metais, a não ser de forma tolerável;
- O material deve ser biofuncional, ou seja, deve ter as características adequadas para cumprir a função desejada, pelo tempo desejado;
- O material deve ser esterilizável.

Paralelamente à biocompatibilidade, é importante que o implante permita o desempenho imediato e com êxito da função específica (estática e dinâmica) da parte do corpo que está sendo substituída. Esta característica está embutida no conceito de biofuncionalidade (RAVAGLIOLI, 1992; SHACKELFORD, 2005). Nesse conceito estão incorporados, também, os problemas associados à degradação química dos materiais, visto que o meio fisiológico pode ser bastante agressivo - mesmo aos materiais considerados extremamente inertes quimicamente, levando à redução da eficiência do implante.

2.3. Classificação dos Biomateriais

Os biomateriais podem ser classificados de acordo com o seu comportamento fisiológico em (HENCH, WILSON, 1993; RAMAKRISHNA *et al.*, 2004; WISE, 2004):

- a) **Biotoleráveis:** materiais apenas tolerados pelo organismo, sendo isolados dos tecidos adjacentes por meio da formação de camada envoltória de tecido fibroso. Esta camada é induzida por meio da liberação de compostos de químicos, íons, produtos de corrosão e outros por parte do material implantado. Quanto maior a espessura da camada de tecido fibroso formada, menor a tolerância dos tecidos ao material. Os materiais biotoleráveis são praticamente todos os polímeros sintéticos assim como a grande maioria dos metais.

- b) Bioinerte:** materiais também tolerados pelo organismo, mas em que a formação de envoltório fibroso é mínima, praticamente inexistente. O material não libera nenhum tipo de componente ou, mais realisticamente, o faz em quantidades mínimas. A quantidade de células fagocitárias na interface é mínima, a resposta fagocítica será passageira e uma fina cápsula tomará lugar após o implante. Em alguns casos esta camada é praticamente imperceptível. Os materiais bioinertes mais utilizados são alumina, zircônia, titânio, ligas de titânio e carbono (HENCH *et al.*, 2000; NAVARRO *et al.*, 2008).
- c) Bioativos:** materiais em que ocorrem ligações de natureza química entre material e tecido ósseo (osteointegração). Em função da similaridade química entre estes materiais e a parte mineral óssea, os tecidos ósseos se ligam a eles, permitindo a osteocondução por meio do recobrimento por células ósseas. Os principais materiais desta classe são os vidros e vitro-cerâmicas bioativos, a hidroxiapatita e os compostos de fosfato de cálcio.
- d) Absorvíveis:** materiais que, após certo período de tempo em contato com os tecidos, acabam sendo degradados, solubilizados ou fagocitados pelo organismo. Tais materiais são extremamente interessantes em aplicações clínicas em função de ser desnecessária nova intervenção cirúrgica para a retirada do material de implante. Os principais exemplos desses materiais são o fosfato tricálcico (TCP) e o poli (ácido lático).

Apesar dessa classificação, até recentemente os dispositivos médicos a partir de materiais de fase única, homogêneos e isotrópicos, tais como os materiais cerâmicos, poliméricos e metálicos (RAMAKRISHNA *et al.*, 2004). Biomateriais em *scaffolds* são aqueles que possuem arcabouço tridimensional poroso, propriedades bioativas e biodegradáveis, que servem de molde para a formação do novo tecido (LIU; MA, 2004). Devem possuir uma estrutura tridimensional que mimetize os meios físicos e químicos do tecido saudável, para guiar a migração, diferenciação e proliferação tecidual (VUNJAK-NOVAKOVIC; KAPLAN, 2006; TAYLOR; KHAN; LAURENCIN, 2009).

2.4. Biomateriais Cerâmicos

Os materiais cerâmicos foram utilizados pela primeira vez como biomateriais há cerca de 90 anos. Inicialmente, a atenção era voltada para o desenvolvimento de tipos que provocassem uma mínima ou nenhuma reação do tecido, características típicas destes materiais em meios agressivos. Mas, o decorrer do tempo e o aumento do conhecimento na área dos materiais cerâmicos geraram proposta conceitualmente oposta: as biocerâmicas deveriam provocar reações de formação de tecido e, se possível, com a formação de uma ligação íntima entre a cerâmica e os tecidos (SANTOS, 2002). Os materiais cerâmicos são utilizados por conta das suas características, tais como: boa biocompatibilidade, resistência à corrosão e alta resistência à compressão. Como desvantagens, podem ser citadas fragilidade, baixa resistência à fratura, dificuldade de fabricação, baixa confiabilidade mecânica e falta de resiliência, o que vem estimulando pesquisadores a desenvolver biomateriais na forma de compósitos, como alternativa em aplicações de bioengenharia (RAMAKRISHNA *et al*, 2004).

As biocerâmicas podem ser classificadas de acordo com sua aplicação em:

- a) Estruturais: onde possuem elevada resistência mecânica sob compressão quando comparadas com metais e polímeros, e são geralmente bioinertes (por exemplo, alumina e zircônia);
- b) Não estruturais: são aquelas com baixa resistência mecânica quando comparadas com as estruturais, uma vez que não precisam suportar cargas. Em geral, são bioativas ou absorvíveis, densas ou porosas.

Ainda podem ser classificadas de acordo com as características do material, sendo:

- a) Biocerâmicas densas inertes: cuja porosidade é considerada nula. Sua união ao osso é de forma morfológica e se realiza de três formas: por crescimento do tecido nas irregularidades superficiais do implante, por união através de um cimento acrílico ou por acoplamento do implante no defeito por pressão. A alumina monocristalina ou policristalina é um exemplo típico desse grupo;

- b) Biocerâmicas porosas inertes: onde a união ao osso é mecânica e a fixação biológica acontece pelo crescimento do osso através dos poros do implante. A alumina policristalina também é um exemplo típico desse grupo;
- c) Biocerâmicas densas ou porosas bioativas: a união ao tecido ósseo é química e a fixação bioativa. Alguns exemplos desse grupo são a hidroxiapatita, os biovidros bioativos e as vitrocerâmicas bioativas;
- d) Biocerâmicas densas reabsorvíveis: o implante é substituído lentamente pelo osso. Exemplos típicos são os fosfatos tricálcicos (TCP) e outros fosfatos assim como o sulfato cálcico (SASTRE *et al.*, 2004).

2.4.1. Hidroxiapatita

Hidroxiapatita (HA) é um fosfato de cálcio hidratado, componente majoritário (cerca de 95%) da fase mineral dos ossos e dentes humanos. A fórmula química da hidroxiapatita é representada por: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$.

A palavra hidroxiapatita é formada pela junção das palavras hidroxila e apatita. Hidroxila refere-se ao grupo hidroxila (OH) e apatita é um mineral. A palavra apatita vem do grego e significa “enganadora”, em função de ela ser confundida com turmalina, berilo e outras. A hidroxiapatita é o material utilizado pelos vertebrados para compor o esqueleto, devido à sua capacidade de atuar como reserva de cálcio e fósforo. Além disso, a hidroxiapatita biológica é ainda composta por íons em concentrações diversas, tais como: Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , CO_3^{2-} , etc., permitindo o controle desses importantes íons nos líquidos corporais por meio da sua liberação ou armazenamento.

Devido à similaridade química da hidroxiapatita com a fase mineral dos tecidos ósseos, ela é um dos materiais mais biocompatíveis conhecidos. Isto favorece o crescimento ósseo para os locais em que ela se encontra (osteocondutor), estabelecendo ligações de natureza química entre ela e o tecido ósseo (bioativo), permitindo a proliferação de fibroblastos, osteoblastos e outras células ósseas, as quais não a distinguem da superfície óssea, o que indica a grande similaridade química superficial.

A superfície da hidroxiapatita permite a interação de ligações do tipo dipolo, fazendo que moléculas de água e proteínas sejam adsorvidas na superfície induzindo, assim, a regeneração tecidual.

Dentre as propriedades físicas e mecânicas, a hidroxiapatita possui densidade de $3,156 \text{ g/cm}^3$, 5 Mohs de dureza e coeficiente de expansão térmica de $11,6 \cdot 10^{-6} \text{ K}^{-1}$. Além disso, possui módulo de elasticidade entre 40 e 100 GPa, e resistência mecânica à compressão em torno de 100 MPa, para hidroxiapatita compacta. Em geral, as propriedades mecânicas da hidroxiapatita são similares às dos componentes mais resistentes do osso humano (SASTRE *et al.*, 2004).

As principais aplicações da hidroxiapatita são: reparo de defeitos ósseos em aplicações odontológicas e ortopédicas; aumento de rebordo alveolar; coadjuvante na colocação de implantes metálicos; regeneração guiada de tecidos ósseos; reconstrução bucomaxilofacial; equipamentos percutâneos; reparo e substituição de paredes orbitais; substituição do globo ocular; recobrimento de implantes metálicos.

2.4.2. Titânia

O titânio (Ti) é o nono elemento mais abundante da Terra; é um elemento que possui uma forte afinidade por oxigênio, fazendo com que a maior parte ocorra na forma de óxido. Assim, esse elemento químico forma compostos com estados de oxidação +2, +3, +4, sendo o estado +2 correspondente à perda de dois elétrons 4s e os estados de oxidação mais altos correspondem à perda de um ou dois elétrons 3d (lembrando que essencialmente nos estados de oxidação mais altos, os elétrons não são completamente perdidos, mas compartilhados com átomos mais eletronegativos. Essa perda de elétrons dá origem ao óxido de titânio, ou titânia, que é um sólido branco utilizado como pigmento opacificante em tintas, papéis, tecidos, plásticos e outros materiais (CHIANG *et al.*, 1997).

O óxido de titânio ocorre naturalmente em diversos minerais, um dos quais encontra-se o rutilo que possui um índice de refração maior que o diamante, mas é muito macio para ser usado como pedra preciosa. Essa característica permite que se obtenha granulometrias muito finas no processo de moagem. Além disso, não é um produto tóxico,

é bastante estável e barato (BRAUN *et al*, 1992). Também pode ser encontrado na forma anatase e brookita. Essas estruturas são diferentes entre si, e consistem de cátions Ti^{4+} no centro de um octaedro de oxigênio. Na estrutura rutilo, que tem simetria tetragonal, a estrutura é construída através de ligação octaédrica. Na estrutura anatase, o arranjo dos ânions e cátions é similar e o cristal é novamente tetragonal, porém cada octaedro é distorcido e divide quatro arestas com outro octaedro. Na brookita, a estrutura é bem mais complicada, onde o octaedro divide tanto as arestas quanto as quinas. Dessa forma, a tendência rutilo-anatase-brookita é de sempre diminuir simetria (CARTER e NORTON, 2007).

A grande maioria dos implantes à base de titânio comercialmente puro apresenta sobre a sua superfície, uma camada de titânia estável formada espontaneamente, dificultando sua interação com o tecido vivo. Um implante necessita de uma estrutura superficial micromorfológica (rugosidade e porosidade), não só para assegurar a ancoragem mecânica do osso na superfície, mas também para ativar a osseointegração. Assim sendo, muitas pesquisas buscaram essa superfície estrutural depositando uma camada de titânia, muito mais reativa; é a partir daí que surge o interesse em descobrir as propriedades desse material para fins biológicos quando combinado a hidroxiapatita podendo vir a formar um biomaterial com propriedades intermediárias.

2.5. Ensaio em biomateriais

Para se avaliar se um biomaterial pode ser usado em aplicações médicas, alguns ensaios têm que ser feitos, a fim de avaliar a biocompatibilidade deste. Tais ensaios são realizados *in vitro* e *in vivo* (RATNER *et al*, 1996; ANDERSON *et al.*, 2004).

Os ensaios *in vitro* permitem obter dados de forma rápida e relativamente barata da interação biológica, sem, contudo, informar sobre o comportamento do biomaterial em sistemas mais complexos, como por exemplo, o corpo humano. O grande objetivo ao se realizar ensaios *in vitro* é minimizar o uso de animais nos experimentos, porém, para fins de implantes, tais ensaios podem não ser relevantes.

Para os ensaios *in vivo*, o uso de animais é imprescindível, pois através deles, pode-se modelar o ambiente que poderia ser encontrado em seres humanos. Entretanto, tem-se um grande número de animais que podem ser empregados, dando assim um grande intervalo de uso de anatomia animal, fisiologia e bioquímica. A grande pergunta que se faz é se tais modelos animais irão permitir um resultado conciso para prever a utilização do biomaterial em condições humanas. Com isso, sem a validação através de casos clínicos em humanos, sempre é difícil obter conclusões fortes via desempenho em animais.

O primeiro passo para se avaliar biomateriais em animais é escolher um modelo animal que represente da forma mais próxima possível a anatomia e bioquímica humana onde será feito o implante. Além disso, os experimentos têm de ser planejados para que se use a menor quantidade possível de animais, além de garantir que estes irão ser tratados com dignidade, garantindo a maior quantidade possível de informações relevantes (RATNER *et al*, 1996).

Quando ensaios em sistemas vivos são realizados, a obtenção de resultados, com grande variação de resultados experimentais, é comum e quanto mais complexo é o sistema, maior é a variação de resultados que pode ser esperado. Para minimizar este problema, o uso de ferramentas estatísticas é bem empregado, com ênfase em duas etapas: o cálculo de um número ideal de amostras, para que se possa assegurar um valor mínimo de erro; e após realização dos ensaios, garantir o máximo de informações úteis. Para isso, várias instituições internacionais, tais como ISO e ASTM, têm colocado normas, a fim de garantir melhores resultados via ensaios padronizados. Outros protocolos de ensaios são especificados por órgãos governamentais e instituições de pesquisa (RATNER *et al*, 1996). Para este trabalho, apenas os ensaios *in vitro* serão abordados.

2.5.1. Características que devem ser avaliadas para biomateriais

O termo citotoxicidade é utilizado para determinar os efeitos que as células são submetidas quando em contato com biomateriais, tais como morte, alteração na permeabilidade da membrana celular, inibição enzimática, etc., em nível celular. Estes efeitos são distintamente diferenciados dos fatores físicos que afetam a adesão celular (carga superficial de um material, higroscopicidade, hidrofobicidade, etc.). Dentre as

características a serem avaliadas, estão a toxicidade, doses de exposição e de entrega, fatores de segurança, características de solubilidade, etc.

A toxicidade é a característica de um material ser tóxico, ou seja, o quanto de reagente químico que um material desprende em quantidades suficientes capazes de matar as células, quer de forma direta, quer de forma indireta, através de inibição do caminho metabólico principal. O número de células que são afetadas é um indicativo da dose e do potencial do reagente. Embora uma variedade de fatores possa afetar a toxicidade de um reagente químico (por exemplo, composição, temperatura, sistema de ensaio), o mais importante é a dose ou a quantidade de reagente que foi entregue a uma célula individual (RATNER *et al*, 1996).

O conceito de dose entregue a uma célula está relacionado com a quantidade de reagente que, na realidade, é absorvida pela célula. Esta difere do conceito de dose exposta, que é a quantidade que foi aplicada ao sistema de ensaio. Por exemplo, se um animal for exposto a produtos nocivos (dose exposta), apenas uma pequena quantidade da substância inalada será absorvida e entregue aos órgãos internos e células (dose entregue). Uma vez que diferentes células têm diferentes susceptibilidades aos efeitos tóxicos dos xenobióticos (substâncias estranhas), as células que são mais sensíveis são chamadas de células alvo. Utilizando estes dois conceitos, significa que os métodos de cultura de células avaliam a toxicidade das células alvo usando doses entregues da substância de ensaio. Isso distingue os métodos de cultura de células para todos os estudos de animais, que avaliam a dose de exposição e não a dose de célula alvo da substância de ensaio. A diferença em dosagem para o nível celular conta para uma quantidade significativa de diferença em sensibilidade dos métodos de cultura de células comparados com os dados para todos os animais. Para comparar adequadamente os métodos de cultura de células com estudos *in vivo*, deveriam ser comparados com dados de modelos de toxicidade localizados, tais como irritações dermatológicas, implantes e exposição direta do tecido. Tais modelos reduzem as incertezas da dose entregue associada com absorção, distribuição e metabolismo que são inerentes em modelos sistêmicos de ensaios de exposição.

Um sistema de ensaio altamente sensível é desejável para avaliar os perigos potenciais dos biomateriais por conta das características inerentes dos materiais sempre não permitir que a dose seja muito exagerada. Há uma grande concordância sobre a incerteza do

uso de extrapolação de um sistema para outro, tal como do sistema animal para o sistema humano. Para que isto seja permitido, os toxicologistas utilizam o conceito de fatores de segurança para levar em conta as variações intra e inter-espécies. A prática requer ser capaz de exagerar a dosagem clínica humana antecipada em ensaios de sistema não humano. Em um modelo de toxicidade localizado em animais, há uma ampla oportunidade para reduzir a dose da célula alvo por distribuição, difusão, metabolismo e mudanças no número de células expostas (devido à resposta inflamatória). Por outro lado, em métodos de cultura de células, onde as variáveis de metabolismo, distribuição e absorção são minimizadas, a dosagem por célula é maximizada para produzir um sistema de ensaio altamente sensível (RATNER *et al*, 1996).

Os principais componentes de dispositivos médicos são materiais insolúveis em água (polímeros, cerâmicas e metais), o que significa que menos que uma parte do material é solúvel em dez mil partes de água. Outros componentes podem ser incorporados ao produto final com o objetivo de obter propriedades físicas, funcionais, de manufatura e de esterilidade desejadas. Os polímeros, por exemplo, podem ter cargas, lubrificantes, plastificantes, antioxidantes ou outros aditivos, que são incorporados tanto como componentes de formulação, como traços de aditivos adicionados durante o processamento.

A literatura indica que a migração de tais aditivos de um material plástico sólido para solventes líquidos é controlada por resistência difusional com o sólido, concentração química, tempo, temperatura, resistência de transferência de massa no lado do solvente, turbulência fluida na interface sólido – solvente e o coeficiente de partição do aditivo químico no solvente. Devido a essas variáveis, as condições para preparo de extração de biomateriais têm sido cuidadosamente padronizadas para melhorar a reprodutibilidade dos dados.

A dissolução completa dos biomateriais tem sido uma aproximação alternativa para os ensaios *in vitro*. Sua principal limitação é que ela não simula a aplicação clínica pretendida, ou pode criar produtos degradados, o que não ocorre em produtos clínicos. Portanto, a dosagem clínica real ou agente exposto às células em termos farmacocinéticos pode ser exagerada devido à taxa de difusão do material ou dispositivo intacto poder ser muito lenta ou diferente daquela para a dissolução completa (RATNER *et al*, 1996).

2.5.2. Métodos de ensaios *in vitro*

Há três métodos de ensaios que são bem utilizados para avaliar cultura de células: a) contato direto; b) difusão em Ágar; e c) eluição (também conhecido como diluição em extrato). Estes são ensaios morfológicos, o que significa que a medição é realizada através de observações de mudanças na morfologia das células. Tais ensaios diferem entre si na maneira como o material de ensaio é aplicado às células: pode ser realizado por aplicação direta sobre estas ou extraídas em uma solução apropriada, que será posteriormente aplicada às mesmas. A escolha do método de ensaio varia de acordo com as características do material de ensaio, a lógica para realizar o ensaio, e a aplicação dos dados para avaliar a biocompatibilidade (RATNER *et al*, 1996).

Para padronizar os métodos e comparar os resultados dos três ensaios, as variáveis de número de células, crescimento de fase das células (período de replicação de célula freqüente), tipo de célula, tempo de exposição, tamanho da amostra de ensaio (por exemplo, geometria, densidade, espessura, forma) e área superficial da amostra de ensaio devem ser cuidadosamente controladas. Isto é particularmente verdadeiro quando a quantidade de extraíveis tóxicos está no início da detecção onde, por exemplo, um pequeno aumento no tamanho da amostra poderia mudar o resultado de não tóxico para toxicidade moderada ou severa. Abaixo do início da detecção, não se observa variação nessas variáveis (RATNER *et al*, 1996).

2.5.2.1. Ensaio do contato direto (ASTM F813):

Nesse ensaio, utilizam-se monocamadas celulares da linhagem L929 de tecido conjuntivo de camundongo, cultivadas em placas de Petri de 35 mm na presença de RPMI 1640 e 5% de soro feral bovino, a 37°C e 5% de CO₂, durante aproximadamente 408 h. Após a obtenção da confluência adequada, faz-se uma substituição do meio de cultura e são colocadas as amostras dos controles negativos (PEAD e / ou discos de filtros atóxicos), dos controles positivos (látex e / ou discos de filtros embebidos em solução de fenol) e do material-teste em contato direto com a monocamada celular por 24 h. Leva-se em consideração que há presença de componentes tóxicos e que estes podem se difundir pelo

meio de cultura, o que faz com que uma área de contato das amostras na superfície externa das placas seja delimitada, sendo removidas e a monocamada celular corada com solução de cristal violeta. Em seguida, separam-se três índices, a saber: índice de zona (IZ); índice de lise (IL) e índice de resposta (IR) (GÓES *et al.*, 2006).

O índice de zona (IZ) refere-se à área ou zona clara onde as células não foram coradas pelo cristal violeta, enquanto que o índice de lise (IL) indica a porcentagem de células degeneradas ou afetadas dentro da zona de toxicidade. Ambos são estabelecidos para cada placa de cultura, microscopicamente examinada. Com os valores estabelecidos para IZ e IL, pode-se relacioná-los a fim de se obter o índice de resposta (IR), via a expressão:

$$IR = \frac{IZ}{IL} \text{ Equação (2.1)}$$

A Tabela 2.1 indica a descrição dos índices de zona IZ, enquanto que os valores para os índices de lise (IL) estão descritos na Tabela 2.2.

Tabela 2.1 – Valores dos índices de zona (IZ) (GÓES *et al.*, 2006).

| IZ | Descrição | Classificação |
|-----------|---|----------------------|
| 0 | Nenhuma zona sob e ao redor da amostra. | Nenhuma |
| 1 | Zona limitada sob a amostra. | Leve |
| 2 | Zona inferior a 5 mm em torno da amostra. | Suave |
| 3 | Zona limitada entre 5 e 10 mm em torno da amostra. | Moderada |
| 4 | Zona superior a 10 mm em torno da amostra, porém sem envolver toda a placa. | Severa |
| 5 | Zona que envolve toda a placa. | Severa |

Tabela 2.2 – Valores dos índices de lise (IL) (GÓES *et al.*, 2006).

| IL | Descrição | Classificação |
|-----------|----------------------------------|----------------------|
| 0 | Nenhuma lise. | Nenhuma |
| 1 | Menos que 20% da zona afetada. | Leve |
| 2 | Entre 20% e 39% da zona afetada. | Suave |
| 3 | Entre 40% e 59% da zona afetada. | Moderada |
| 4 | Entre 60% e 80% da zona afetada. | Severa |
| 5 | Mais que 80% da zona afetada. | Severa |

2.5.2.2. Ensaio de difusão em Agar (ASTM F-895):

Culturas de linhagem celular L929 de tecido conjuntivo de camundongo são distribuídas sob a forma de uma monocamada em placas de Petri de 35 mm e incubadas por aproximadamente 48 horas, como já citado anteriormente. Após a obtenção da confluência adequada, o meio de cultura líquido é substituído pelo meio de cobertura sólida composta de partes iguais de meio concentrado (2x) e ágar Noble (3%). Amostras dos controles negativos (polietileno de alta densidade e / ou disco de filtro atóxico) e positivos (látex e / ou embebido com solução de fenol) e do material-teste são colocados sobre a superfície do meio de cobertura sólido e incubados por um período de 24 horas para avaliação de suas propriedades citotóxicas (GÓES *et al.*, 2006).

Componentes tóxicos que porventura estejam presentes no material-teste podem se difundir pelo meio de cultura, formando um gradiente de concentração e afetando as células localizadas a diferentes distâncias da amostra. Neste método, semelhantemente ao método do contato direto, é feita uma delimitação da área de contato na superfície externa das placas, onde posteriormente essas são removidas e as células expostas a uma solução do corante vermelho neutro que irá corar as intactas. O índice de zona (IZ) é a área ou zona clara onde as células não foram coradas pelo vermelho neutro, enquanto que o índice de lise (IL) é a porcentagem de células degeneradas ou afetadas dentro da zona de toxicidade e tais índices se relacionam para fornecer o índice de resposta (IR), de forma similar e utilizando os mesmos parâmetros do ensaio do contato direto descrito anteriormente (Equação 2.1).

As amostras são avaliadas em triplicatas em cada um dos experimentos realizados (GÓES *et al*, 2006).

2.5.2.3. Ensaio de Eluição (USP 23):

Este ensaio é utilizado para determinar a reatividade biológica de extratos dos biomateriais, principalmente para polímeros de alta densidade, e para avaliações do tipo dose-resposta.

Na preparação dos extratos, cloreto de sódio 0,9% e meio para cultura de células de mamíferos com ou sem soro fetal bovino são utilizados como solventes extratores. O uso de meio de cultura suplementado com soro é mais utilizado, pois simula mais fielmente as condições fisiológicas (GÓES *et al*, 2006).

O preparo de extratos dos biomateriais a serem avaliados exige uma avaliação específica exige uma avaliação específica dos tamanhos das áreas de extração. Se estas não puderem ser rigorosamente mensuradas, massas de 0,1 g de material elastomérico ou 0,2 g de material polimérico por mililitro (mL) do fluido de extração devem ser utilizadas, tomando-se cuidado para prevenir a contaminação por microorganismos e materiais estranhos. Deve-se observar também para que as condições de extração não causem mudanças físicas no material, tais como fusão ou derretimento das peças do material. Os extratos são preparados aquecendo o meio extrator com o material por 24 horas em incubadoras, na presença de 5% de CO₂. As temperaturas de extração não devem ultrapassar 37°C nos casos de uso do meio-soro como extrator, pois temperaturas altas causam desnaturação das proteínas do soro (GÓES *et al*, 2006).

O ensaio é realizado em culturas celulares da linhagem L929 de tecido conjuntivo de camundongo, distribuídas sob a forma de monocamadas em placas de Petri de 35 mm e incubadas por aproximadamente 48 horas. Após a obtenção da confluência adequada, o meio de cultura é substituído pelos extratos das amostras e dos controles. Os extratos que utilizaram NaCl 0,9% como extrator são diluídos na proporção de 1:4 com meio de cultura e soro. Os experimentos são sempre feitos em triplicata e as placas incubadas por 48 horas a 37°C em 5% de CO₂. Após o tempo de incubação, as placas são examinadas microscopicamente usando o corante cristal violeta (GÓES *et al*, 2006).

A Tabela 2.3 fornece a descrição da reatividade biológica no ensaio, onde as respostas observadas no ensaio devem corresponder aos graus de reatividade estabelecidos pelos padrões utilizados: negativo (0) e positivo (4), ou a algum valor intermediário a estas referências (GÓES *et al.*, 2006).

Tabela 2.3 – Graus de reatividade para o ensaio de eluição (GÓES *et al.*, 2006).

| Grau | Classificação | Condições da cultura |
|-------------|----------------------|---|
| 0 | Nenhuma | Discretos grânulos intracitoplasmáticos: nenhuma lise celular. |
| 1 | Leve | Não mais do que 20% das células são arredondadas, frouxamente ligadas e sem grânulos intracitoplasmáticos; lise celular rara. |
| 2 | Suave | 50% das células são arredondadas e desprovidas de grânulos intracitoplasmáticos; lise celular extensa e áreas vazias entre células. |
| 3 | Moderada | 70% da camada celular contém células arredondadas e/ou que sofreram lise. |
| 4 | Severa | Completa destruição da camada celular. |

2.5.3. Comparação entre ensaios *in vitro*

Alguns artigos são encontrados na literatura, nas mais diversas áreas, onde há a comparação, em termos de sensibilidade, dos ensaios *in vitro*, com resultados indicados comprovando a funcionalidade dos mesmos. Alguns artigos estão indicados a seguir.

Pithon e colaboradores (2008) compararam duas metodologias (ensaio de difusão em ágar e ensaio de incorporação do vermelho neutro), avaliando *in vitro* a biocompatibilidade de elásticos ortodônticos intra-orais das marcas American Orthodontic (EUA) e Morelli (Brasil) através de ensaio de citotoxicidade em cultivo de células HEp-2 (carcinoma de laringe humana). Os resultados obtidos, utilizando-se ambas as metodologias, demonstraram baixa citotoxicidade para os elásticos das marcas American

Orthodontic e alta para marca Morelli. Concluiu-se, então, que as duas metodologias são equivalentes e a escolha do método de ensaio mais adequado deve ser feita de acordo com o tipo de análise que se deseja obter: qualitativo quando se utiliza o método de difusão em ágar ou quantitativo com o método da incorporação do vermelho neutro.

Rogero e colaboradores (2003) realizaram uma avaliação *in vitro* da biocompatibilidade de diferentes tipos de biomateriais pelo ensaio de citotoxicidade em cultivo de células de tecido conectivo de camundongos, NCTC Clone 929 da American Type Culture Collection. O estudo comparativo do ensaio de citotoxicidade foi realizado com duas metodologias: 1) ensaio de difusão em ágar e 2) ensaio de incorporação do vermelho neutro. Os resultados obtidos demonstraram que ambas as metodologias podem ser utilizadas, de acordo com o tipo de amostra a ser analisada.

Em trabalho de Cruz e colaboradores (1998), realizou-se uma comparação dos métodos de difusão em ágar e de extração utilizando as linhagens celulares RC-IAL (células fibroblásticas de rim de coelho) e HeLa (células epiteliais de carcinoma do colo do útero humano), na avaliação da citotoxicidade “*in vitro*” de materiais de uso médico-hospitalar. Os resultados encontrados são similares aos observados por outros autores que avaliaram materiais como, por exemplo, ligas metálicas. Quando foi usado o duodecil sulfato de sódio (SDS) observou-se, nas duas linhagens celulares, diferenças favoráveis ao método de difusão em ágar em duas concentrações, isto é, a sensibilidade deste método foi significativamente maior, por inspeção, em relação ao método de extração, além de se constituir em método mais simples de ser realizado.

2.5.4. Métodos de ensaios *in vivo*

Os ensaios *in vivo* são realizados com o objetivo de fornecer dados sobre o comportamento do biomaterial no meio biológico vivo. Porém, o ensaio não elimina a probabilidade de respostas diferentes quando o produto final for utilizado nos seres humanos, uma vez que há diferença entre as espécies vivas. Mesmo assim, os ensaios *in vivo* são válidos porque trarão informações úteis sobre a reação orgânica induzida pelo produto-teste. O estudo das respostas inflamatórias, agudas e crônicas, bem como a relação

destas no período tardio, com sucesso ou insucesso do biomaterial é realizado via ensaio *in vivo* no modelo animal (GÓES *et al*, 2006).

Para a implantação *in vivo* é preciso considerar quais são as características e onde se pretende usar o biomaterial, assim como a natureza do contato com os tecidos. Desta forma, ensaios gerais podem não ser suficientes para demonstrar a segurança de um biomaterial para uso específico. Deste modo, a aplicação clínica específica do biomaterial determina qual o ensaio mais apropriado. É importante lembrar que não é tão simples fazer uma extrapolação dos resultados obtidos via espécie animal para a espécie humana, devendo-se levar em consideração as semelhanças e diferenças entre espécies animais e o ser humano. Segundo Rezende (GÓES *et al*, 2006),

“A avaliação da biocompatibilidade deve, sobretudo, documentar uma descrição geral do produto, seu uso pretendido, o grau de contato com o tecido, a natureza química do material, a revisão dos dados de citotoxicidade e a biocompatibilidade de cada componente químico. A seleção dos ensaios depende do uso final do biomaterial.”

2.5.4.1. Generalidades sobre o implante e o tecido vivo:

Para se fazer a seleção do modelo animal adequado, deve-se levar em consideração as características dos componentes do biomaterial, do desenho do produto e pelas características do animal. Para a avaliação da biocompatibilidade, deve-se considerar a natureza e a duração da exposição de cada componente, sua natureza química e física, a atividade biológica de qualquer aditivo ou resíduo químico, metabólicos ou produtos de degradação, além da interação entre componentes e os efeitos da esterilização (GÓES *et al*, 2006).

Os princípios básicos da resposta tecidual aos implantes são encontrados na biologia celular e molecular, bioquímica e fisiologia, onde os processos biológicos envolvidos na resposta do tecido são influenciados por fatores relacionados ao implante. Tais fatores são:

- a) Espaço morto criado pelo implante;
- b) Trauma da implantação e conseqüente inflamação;
- c) Agentes solúveis liberados pelo implante como íons ou fragmentos de polímeros;
- d) Partícula de material insolúvel liberada do implante em conseqüência do desgaste;
- e) Alterações na distribuição das forças nos tecidos, causada pela diferença de módulo de elasticidade entre implante e tecido vizinho;
- f) Movimento do implante no local de implantação, resultante da falta de união entre tecido vivo e biomaterial (GÓES *et al*, 2006).

O ensaio *in vivo* pode ser feito em diferentes espécies animais, tais como: camundongos, ratos, coelhos, cães, hamsters, Gerbis, primatas-não humanos, carneiros, porcos, etc., sempre conduzido segundo as normas éticas de experimentação animal (CETEA). O estudo deve ser realizado com o menor número possível de animais e de tal forma a se obter o maior número de informações, para que haja possibilidade de extrapolação dos resultados com segurança, além de eliminar a necessidade de repetições do mesmo ensaio (GÓES *et al*, 2006).

Para avaliação de um biomaterial, em termos de biocompatibilidade em espécie animal, deve-se levar em consideração a resposta tecidual à agressão após a implantação cirúrgica. Independente do resultado de biocompatibilidade, sempre ocorrerá um trauma após a implantação cirúrgica, começando com uma inflamação e prosseguindo através dos passos de cura da ferida. Além desse fenômeno, há a reação de corpo estranho, devido à presença do material reconhecido como não pertencente ao receptor. Se a seqüência normal de cura ocorre, o biomaterial é chamado de biocompatível. Pode ser observada a formação de tecido fibroso em torno do implante, a chamada cápsula fibrosa, onde o grau desse tecido irá depender do material que foi implantado, de suas propriedades de superfície e da capacidade regenerativa das células no tecido adjacente. Células que não regeneram ou de regeneração lenta são mais propensas a formar tecido cicatricial (GÓES *et al*, 2006).

A inflamação crônica pode ser causada pelas propriedades químicas ou físicas do material ou pelo movimento no local de implantação, o que causa lesão celular local, fazendo com que os mediadores da inflamação continuem a ser liberados. Uma substância química do implante pode ser citotóxica e matar as células e um material inerte pode

desencadear reação tecidual se está fragmentado em microns, pois os macrófagos ingerem as partículas e não podem digeri-las e morrem, e a movimentação relativa do tecido e implante rompe as células na interface. Deve ser lembrado ainda que podem ocorrer mudanças no material implantado *in vivo*, que levam à lesão celular (GÓES *et al.*, 2006).

Para que se possa estudar a resposta dos tecidos aos biomateriais, é necessário ter uma metodologia que permita avaliação em níveis tecidual, celular e molecular. Outra variável importante é o tempo de estudo, pois existe uma relação temporal entre os protagonistas celulares e moleculares das reações biológicas e os fatores relacionados com os biomateriais, que atuam com diferentes constantes de tempo nas respostas biológicas. Por haver uma natureza dinâmica das interações tecido-biomaterial, a determinação final da biocompatibilidade deve ser qualificada de acordo com tempo na qual o estudo foi realizado.

2.6. Processos de fabricação de corpos porosos

Segundo Hirschfeld e colaboradores (1996), cerâmicas porosas podem ser classificadas em quatro estruturas básicas: (a) redes de fibras enroladas, (b) estruturas de células fechadas, (c) estruturas de células abertas, e (d) membranas, onde suas aplicações são determinadas por uma única estrutura. Já segundo Saggio-Woyansky e Scott (1992), as cerâmicas porosas podem ser agrupadas em duas categorias gerais: cerâmicas reticuladas e cerâmicas de espuma. Uma cerâmica reticulada é um material poroso composto de vazios interconectados rodeados por uma rede de cerâmica; uma cerâmica de espuma tem vazios fechados com uma matriz contínua de cerâmica. Essas estruturas porosas têm relativamente baixa massa, baixa densidade e baixa condutividade térmica. Essas duas categorias diferem entre si na propriedade de permeabilidade, ou seja, a permeabilidade é alta em cerâmicas reticuladas e baixa em cerâmicas de espuma. Essa diferença acontece devido às estruturas aberta e fechada de cada categoria. Por combinação dos materiais cerâmicos adequados e processamento, os corpos cerâmicos podem também ter alta tenacidade, alta resistência a ataques químicos, resistência a altas temperaturas e alta uniformidade estrutural. Essas propriedades fazem as cerâmicas porosas apropriadas para uma variedade de aplicações.

Os metais fundidos, particularmente o alumínio, geralmente contêm sólidos de impurezas que são eliminados para o produto final de metal fundido. Esses sólidos aparecem como inclusões após solidificação e podem ser deletérios em vários aspectos como diminuição de características de brilho final e de proteção anódica, redução de algumas propriedades mecânicas, dentre outras. Para que isso não aconteça, é desejável selecionar um filtro para remover e minimizar esses sólidos no produto final. Normalmente utilizam-se filtros de esponjas reticuladas de alumina, com propriedades como alta porosidade, baixa variação de pressão e alta resistência ao ataque do alumínio (HAN *et al.*, 2002), enquanto que as espumas de materiais cerâmicos podem ser utilizadas como materiais de isolantes térmicos e queimadores de combustão de gás (SAGGIO-WOYANSKY e SCOTT, 1992).

2.6.1. Método da esponja polimérica:

O método da esponja polimérica consiste, resumidamente, na impregnação de uma esponja polimérica com pasta cerâmica. Após a queima da esponja, ocorre a consolidação de um corpo cerâmico poroso. Esse método possui oito etapas, que serão descritas a seguir.

a) PASSO 1: Seleção da esponja polimérica

Nessa etapa, o tamanho do poro da esponja determina o tamanho do poro do produto final após contração por queima e sinterização. Tipicamente, a quantidade de poros varia de 2 a 25 poros/cm. As densidades das células podem ser aumentadas por compactação a quente da esponja. Outra consideração da esponja é a resiliência, ou sua habilidade de recuperar seu formato original.

Adicionalmente, a esponja deve se volatilizar em temperaturas abaixo da necessária para sinterizar o corpo cerâmico final. Alguns dos materiais poliméricos da esponja que podem satisfazer esses requisitos são poliuretano (PU), policloreto de vinila (PVC), poliestireno (PS) e látex. A baixa temperatura de amolecimento do poliuretano torna-o

particularmente atraente como material de esponja. Quando a esponja impregnada é aquecida para que esta possa volatilizar, a esponja de poliuretano prontamente amolece e dissipa-se, aliviando, desse modo, qualquer tensão térmica que poderia romper o corpo cerâmico não sinterizado.

b) PASSO 2: Preparação da pasta cerâmica

A pasta básica é feita de partículas cerâmicas finamente divididas, um líquido e aditivos. As partículas cerâmicas escolhidas dependem da aplicação particular e das propriedades requeridas para o produto final. Alguns exemplos de partículas cerâmicas utilizadas para produzir estruturas reticuladas para uma variedade de aplicações são zircônia, mulita, talco, sílica, alumina, magnésia, fosfatos de cálcio, titânia e argilas calcinadas. Geralmente, quaisquer óxidos, boretos, nitretos, carbetos, silicetos ou minerais podem ser utilizados como componente cerâmico na pasta. Tipicamente, as partículas cerâmicas são menores que 80 mesh (180 μm); entretanto, também é comum partículas com 325 mesh (45 μm). A água é mais frequentemente utilizada como carregador na pasta. A quantidade de água varia de 10% a 40% do total do peso da pasta.

c) PASSO 3: Aditivos (para o pó e água)

Alguns aditivos são normalmente adicionados à pasta, com o objetivo de mudar certas características, como, por exemplo, deixá-la tixotrópica (ou seja, mostra uma diminuição de viscosidade ao longo do tempo a uma velocidade de cisalhamento constante). A seguir serão discutidas as aplicações para cada tipo de aditivo.

O ligante confere resistência à estrutura cerâmica após secagem e previne colapso durante a volatilização da esponja. Alguns ligantes comuns utilizados são: o silicato de sódio ou potássio, ortofosfato de sódio e ortoborato de magnésio. Muitos desses ligantes foram desenvolvidos na década de 60 e 70.

O agente reológico confere tixotropia à pasta, ou seja, quando a esponja polimérica é impregnada com a pasta cerâmica, a pasta deve ser fluida o suficiente para entrar, preencher e cobrir uniformemente a rede da esponja e subseqüentemente recuperar

viscosidade suficiente sob condições estáticas para permanecer na esponja. Os agentes reológicos mais comuns são as bentonitas e caulim, podendo ser utilizada também a montmorilonita para alumina reticulada, sendo que esta, além de promover a tixotropia, também aumenta a resistência da estrutura resultante de alumina.

Os agentes anti-espumantes são adicionados para prevenir a formação de espuma da pasta. Segundo Saggio-Woyansky e Scott (SAGGIO-WOYANSKY e SCOTT, 1992), o agente anti-espumante reduz a tendência da pasta de formar “pontes” ou “janelas” na estrutura porosa. Essa estrutura fechada resulta em permeabilidade reduzida do produto final.

O agente floculante pode ser adicionado à pasta cerâmica para aumentar a aderência da barbotina ao material da esponja. Já o agente de fixação por ar pode ser adicionado à barbotina cerâmica para ajudar na fixação ou na ligação da pasta cerâmica para a queima. O agente mais comumente utilizado é o ortofosfato de alumínio em 2,5% a 25% em peso. Outros exemplos de agentes são o ortoborato de magnésio e o hidroxiclreto de alumínio.

d) PASSO 4: Imersão da esponja na pasta

Uma vez selecionada a esponja e a pasta cerâmica preparada, o próximo passo é impregnar a esponja com a pasta. Tipicamente, a esponja é comprimida para remover o ar, imersa na pasta, depois deixada para expandir. A pasta infiltra as células abertas da esponja. Neste ponto, o passo de compressão / expansão pode ser repetido até atingir a densidade desejada.

e) PASSO 5: Remoção do excesso de pasta na esponja

Após a esponja ter sido impregnada, o próximo passo é remover entre 25% e 75% da pasta cerâmica na esponja. As técnicas variam desde uma simples compressão da esponja entre duas faces de madeira a métodos mais avançados, tais como centrifugação ou passagem através de rolos compressores. Nesse estágio, a espuma impregnada pode ser mais facilmente moldada, uma vez que ela está ainda flexível. Qualquer forma obtida nesse ponto deve ser sustentada até que a cerâmica seja sinterizada.

f) PASSO 6: Secagem

Após o excesso da pasta ser removido, a esponja impregnada é seca para que ocorra deposição das partículas cerâmicas na esponja. A secagem pode ser feita ao ar, em estufa ou por aquecimento em microondas. A secagem ao ar tipicamente acontece entre oito e vinte e quatro horas, enquanto que a secagem em estufa é feita no intervalo de temperatura de 100°C a 300°C, de quinze minutos a seis horas.

g) PASSO 7: Queima da esponja polimérica / retirada dos orgânicos voláteis

A estrutura reticulada seca é aquecida em ar entre 350°C e 800°C, baixa taxa de aquecimento, 0,5°C/min, por exemplo, para eliminar os orgânicos da pasta e para volatilizar a esponja polimérica. Em alguns casos, um ambiente inerte é preferível. A temperatura escolhida para essa etapa depende da temperatura para a qual o material da esponja escolhida se decompõe. Aquecimento lento e controlado até a temperatura desejada é crítico para essa etapa. Aquecimento rápido pode resultar em colapso da estrutura cerâmica. Essa etapa pode ser combinada com a etapa final de sinterização da cerâmica, mas, na maioria dos casos, as etapas de secagem e sinterização separadas são importantes para controle preciso da estrutura reticulada final.

h) PASSO 8: Sinterização da cerâmica

A etapa final é a densificação da rede cerâmica por sinterização. Nessa etapa, o aquecimento controlado é importante para prevenir o colapso da estrutura cerâmica. As temperaturas de sinterização variam de 1000°C a 1700°C. Os parâmetros de controle utilizados, como temperatura e tempo, dependem do material cerâmico inicial e das propriedades finais desejadas.

Em estudo realizado sobre a preparação de cerâmicas porosas reticuladas de carbetto de silício, Zhu e colaboradores (2002) caracterizaram a parte reológica das pastas

preparadas, além do processo de recobrimento e resistência à flexão em função da densidade relativa, mostrando qual o valor ótimo de pH da dispersão e que o aumento da resistência à flexão é diretamente proporcional ao aumento da densidade relativa.

2.6.2. Método da adição de espumante:

Em contraste com o método da esponja polimérica, uma variedade de aproximações para confeccionar cerâmicas porosas é praticada pelo método da adição de espumante. Na maioria dos casos, uma mistura química contendo o componente cerâmico desejado mais uma variedade de constituintes orgânicos é tratada para desenvolver um gás que cria bolhas no material e, conseqüentemente, a espuma. O material cerâmico poroso resultante é seco e, em seguida, sinterizado. Segundo Saggio-Woyansky e Scott (1992), o método espumante apresenta algumas vantagens sobre o método da esponja polimérica. Certas formas, composições e densidades são mais facilmente produzidas por formação de espuma. Corpos cerâmicos com células fechadas com poros pequenos não podem ser confeccionados pelo método da esponja polimérica.

Peng e colaboradores (2000) realizaram um estudo sobre a microestrutura de corpos cerâmicos confeccionados pelo método espumante, onde se caracterizou a porosidade destes tipos de amostras cerâmicas, além da razão entre o diâmetro das aberturas e o diâmetro da célula em função da porosidade, mostrando, também, a uniformidade da estrutura cerâmica. Em outro estudo, Peng, Fan e Evans (2000) mostraram os fatores que afetam a microestrutura de um corpo cerâmico fino, mostrando que a resistência à compressão dessas amostras aumentou à medida que houve uma diminuição do grau de expansão, sugerindo, assim, que a resistência das estruturas aumentou.

2.6.3. Método da adição de cera:

O método de adição de cera, natural ou sintética, tem sido bastante utilizado para materiais cerâmicos com a função de criar poros para facilitar a saída de outros componentes nas primeiras etapas de remoção do ligante. A cera também pode ser utilizada

como componente majoritário do ligante, principalmente quando se deseja uma baixa viscosidade da mistura, como é o caso do processo de moldagem de cerâmicas por injeção à baixa pressão (BRUMATI, 1995).

Prado da Silva e colaboradores (2002a), em estudo sobre a produção de biomateriais porosos baseados em compósitos de hidroxiapatita reforçados com vidro, utilizaram amido de batata e casca de amêndoa como formadores de poros, onde concluíram que os métodos de processamento podem ser utilizados para produzir uma microestrutura homogênea de poros. Em trabalho sobre implantes de carbonato de cálcio bioativo poroso, Lemos e Ferreira (1999) utilizaram esferas de cera e amido, concluindo que a técnica de consolidação com amido é um método interessante para a fabricação de materiais biocerâmicos porosos. Em estudo sobre materiais com hidroxiapatita reforçada com vidro poroso, Prado da Silva e colaboradores (2002b) utilizaram amido de batata modificado, casca de amêndoa e esferas de cera como formadores de poro e concluíram que o método utilizando esferas de cera aparentou ser mais efetivo para a produção de amostras com poros interconectados e com diâmetro médio maior que 100 μm .

2.7. Porosidade

Com a utilização cada vez maior de cerâmicas avançadas, provenientes de materiais processados quimicamente, tornou-se necessária uma caracterização mais detalhada do que a utilizada para cerâmicas tradicionais, além de um conhecimento profundo de suas propriedades macroscópicas, como, por exemplo, tamanho de partícula, área superficial, porosidade e densidade (SHIELDS, 1991). Os defeitos (vazios ou poros) desempenham um papel importante quando os engenheiros trabalham com projetos de equipamentos e componentes cerâmicos, uma vez que a resistência destes pode ser diretamente equacionada com o tamanho do defeito, além de ser tratado estatisticamente devido à presença de uma infinidade de falhas (ABE, 1985). Geralmente, as mudanças mais significativas que ocorrem durante o processo de queima incluem aumento no tamanho de partícula e mudanças na forma e tamanho dos poros, que usualmente leva a uma diminuição da área específica. A eliminação da porosidade maximiza certas propriedades, tais como

resistência, translucidez e condutividade térmica. Duas categorias gerais de caracterização cerâmica são caracterização atômica, que define a localização relativa dos átomos, e a caracterização de propriedades macroscópicas, especialmente utilizando medições de porosidade, densidade e área específica (SHIELDS, 1991).

Os sólidos podem eventualmente apresentar microestruturas complexas e a maioria dos materiais são, até certo ponto, porosos. As aplicações práticas de um material podem depender apenas das suas propriedades macroscópicas como condutividade térmica, índice de refração, resistência mecânica, ou então das propriedades de catálise, adsorção e permeação. Além disso, as propriedades macroscópicas estão proximamente conectadas à microestrutura porosa do sólido, caracterizada por características tais como densidade, área superficial, porosidade, tamanho de poro, geometria e topologia do poro, além da distribuição do tamanho do poro (LEE *et al.*, 1996).

Vários métodos foram desenvolvidos para a caracterização de um sólido poroso, tais como picnometria, adsorção de gás, medições por penetração de fluido e técnicas calorimétricas, além de espalhamento de radiação, técnicas de ultrassom, entre outras, sendo que os métodos mais populares são o de adsorção de gás e intrusão por mercúrio.

2.8. A origem da porosidade:

Segundo Lee e colaboradores (1996), os materiais porosos podem ser grosseiramente divididos em duas categorias: aglomerados (montagens consolidadas e rígidas de partículas) e agregados (montagens não rígidas, não tão firmemente empacotadas de partículas). Muitos géis inorgânicos e cerâmicas são formados por empacotamento de partículas pequenas e subsequente consolidação. Os vazios entre partículas produzem uma rede interconectada que envolve cada partícula. A estrutura final da rede de poros depende principalmente do arranjo original das partículas iniciais e de seus tamanhos, forma e da maneira de empacotamento das partículas constituintes.

É necessário distinguir entre vazios intrapartículas ou interpartículas para agregados ou aglomerados de partículas porosas. Uma rede de macroporos (poros com diâmetros entre 50 nm e 1000 nm) é formada por interstícios entre partículas, que são contínuos e se estende pelo sólido. Os poros intrapartículas são tipicamente dos tamanhos de microporos

(diâmetro de poros entre 0,2 e 2 nm) e mesoporos (diâmetro de poros entre 2 e 50 nm). Os poros muito pequenos intrapartículas comumente dão uma contribuição maior para a área superficial do sólido, enquanto que o vazio interpartícula tem maior peso no volume total de vazios.

Os corpos porosos também podem ser obtidos por processos de substrato, onde certos elementos de uma estrutura original são seletivamente removidos para criar poros. Alguns exemplos são a formação de poros de óxidos metálicos por decomposição térmica de hidróxidos, carbonatos, nitretos, oxalatos, etc.. Para descrever uma estrutura porosa, deve-se considerar a geometria (tamanho e forma) dos poros e a topologia da rede de poros, sabendo-se que nem a forma nem o tamanho dos poros serão uniformes ao longo do sólido (LEE *et al.*, 1996).

2.9. Sinterização:

A sinterização pode ser definida como um processo que utiliza calor e diversos mecanismos de transporte de material para converter pós cerâmicos em sólidos policristalinos densos. Num compacto cerâmico verde, diversos fatores são desejáveis para o controle da microestrutura e das propriedades finais dos produtos sinterizados. A uniformidade (homogeneidade, distribuição dos grãos, etc.) permite que a sinterização ou densificação ocorra a uma temperatura mais baixa e de maneira uniforme através do compacto. Esta uniformidade depende, inicialmente, das qualidades originais do pó cerâmico utilizado, tais como partículas finas, distribuição homogênea dos tamanhos das partículas e composição química. Uma vez satisfeitas às exigências relativas ao pó, outros fatores deverão ser considerados (KIMINAMI, 1994).

As operações de sinterização trazem alterações bastante significantes ao produto cerâmico, a saber: (a) redução na área específica total; (b) redução no volume aparente total; e (c) aumento na resistência mecânica. Embora as operações de sinterização não produzam mudanças de fases, é comum encontrar alterações significantes, tais como a formação de um líquido (VAN VLACK, 1973).

Pós excessivamente finos apresentam baixa densidade aparente e podem causar problemas de compactação e aglomeração e conduzem à obtenção de compactos verdes não uniformes. Portanto, é desejável que a massa do pó esteja igualmente distribuída no corpo verde, isto é, o compacto deve apresentar uma densidade homogênea. Caso ocorram flutuações locais de densidade no compacto, as regiões de maior densidade sofrerão menor retração que as regiões menos densas, devido às diferenças de velocidade durante a sinterização. Esse efeito, além de afetar de modo notável a forma final da peça cerâmica, cria tensões que aumentam ou fazem surgir espaços vazios. Estes, por serem concentradores de tensões, auxiliam a propagação de trincas no corpo sinterizado (GERMAN, 1996).

Outra característica importante desejável para o compacto verde é uma alta densidade inicial. Em geral, pós finos apresentam, depois de prensados, densidades relativamente baixas. Um pó pouco compactado, quando é sinterizado, diminui sua energia superficial pela formação de partículas grandes separadas, ao invés de uma peça sólida. A retração observada neste caso é muito grande e não uniforme. Uma baixa porosidade inicial e uma distribuição homogênea dos tamanhos dos poros são outras características desejáveis no compacto verde sob o ponto de vista da sinterização. Elevada porosidade inicial no compacto exigirá temperaturas mais elevadas para que a sinterização se processe adequadamente e se atinja a densificação desejada do material, pois os poros inibem o crescimento de grãos e diminuem a velocidade de sinterização (KIMINAMI, 1994).

Durante a sinterização, as partículas se unem em um contato mais íntimo, o que reduz a porosidade. A força motriz é a redução da energia superficial total, devida ao contato e crescimento entre os grãos. Os átomos dos grãos pequenos são transferidos para os maiores, e os poros são substituídos por materiais sólidos (VAN VLACK, 1973). Essa transferência de massa pode ocorrer por quatro mecanismos, conforme mostra a Tabela 2.4. Cada mecanismo pode ocorrer individualmente ou em combinação com outros mecanismos para se atingir a densificação do corpo cerâmico. A Figura 2.1 mostra o esquema do transporte material por fase vapor.

Tabela 2.4 – Mecanismos de sinterização (KIMINAMI, 1994).

| TIPO DE SINTERIZAÇÃO | MECANISMO DE TRANSPORTE DE MATERIAL | FORÇA MOTRIZ |
|-----------------------------|--|-------------------------------------|
| Fase vapor | Evaporação – condensação | Diferenças nas pressões de vapor |
| Fase líquida | Escoamento viscoso, difusão | Pressão capilar, tensão superficial |
| Líquido reativo | Escoamento viscoso, solução – precipitação | Pressão capilar, tensão superficial |

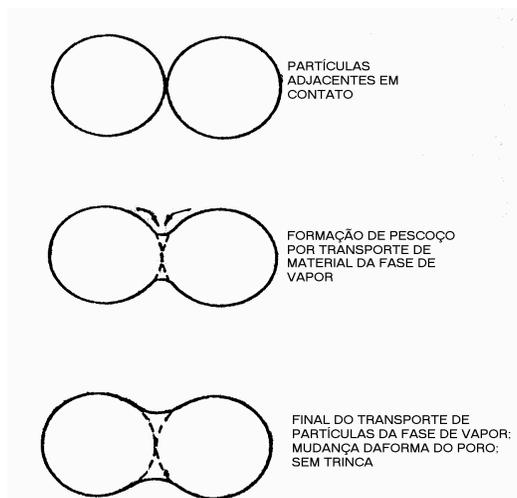


Figura 2.1 – Esquema do transporte de material fase vapor (KIMINAMI, 1994; VAN VLACK, 1973).

Desde o início dos estudos de sinterização de pós, a alumina tem servido de modelo para investigações e entendimento dos processos de densificação, embora não seja tão simples o reconhecimento da complexidade deste fenômeno. Diferentes fatores influenciam de forma significativa a sinterização, tais como: temperatura, tempo, características do pó a ser sinterizado, densidade a verde, atmosfera de queima e aditivos (NOGUEIRA, 1992).

2.9.1. Efeito do tamanho e forma da partícula:

Pós com partículas muito pequenas são sinterizadas em tempos mais curtos do que aqueles com partículas maiores (mais grosseiras), visto que a energia de superfície destas é muito alta e produz uma força motriz muito grande para sinterização. Já a forma da partícula é importante porque é relacionada com as mudanças na área de superfície, ou seja, se há uma diminuição na esfericidade e aumento na rugosidade da partícula, por exemplo, há um benefício na sinterização (NOGUEIRA, 1992).

Liu (LIU, 1997), em estudo sobre a influência da distribuição do tamanho de partícula nas densidades a verde e sinterizada em blendas de alumina e cera mostrou que um aumento na fração volumétrica de sólidos até 65% em volume aumenta ambas as densidades.

2.9.2. Efeito da densidade a verde:

Tem sido observado na prática, que a densidade da amostra antes de ser sinterizada (a verde) tem um efeito considerável na densidade final do produto, ou seja, uma alta densidade a verde produz uma alta densidade após sinterização. A Figura 2.2 mostra o efeito da densidade a verde na densidade final e tamanho de grão para alumina contendo 0,25% em massa de MgO (NOGUEIRA, 1992).

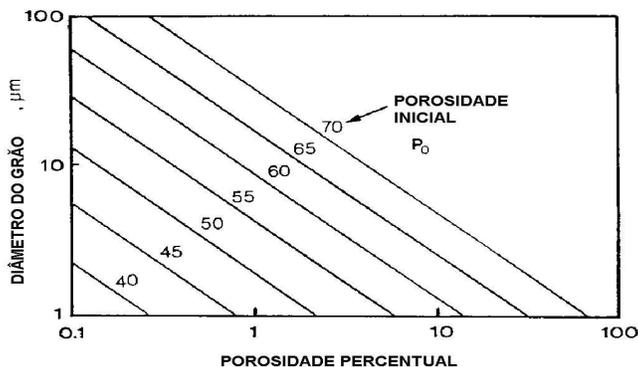


Figura 2.2 - Efeito da densidade a verde na densidade final e tamanho de grão para alumina contendo 0,25% em massa de MgO (NOGUEIRA, 1992).

2.9.3. Efeito dos aditivos:

Desde os primeiros estudos de sinterizar a alumina para densidade total, sabe-se que a inclusão de aditivos pode influenciar de forma benéfica a cinética de sinterização do material (NOGUEIRA, 1992).

Em estudo realizado por Dorre e Hübner (1984), foi mostrado que, de 23 tipos de aditivos utilizados para corpos cerâmicos confeccionados a base de alumina, MgO e NiO contribuem para inibir o crescimento descontínuo e exagerado do grão, além de ajudar a promover a densificação.

Segundo Reed (1986), MgO aparentemente inibe o crescimento do tamanho de grão na alumina através do aumento da difusividade de superfície e conseqüentemente, aumento da mobilidade de poro e que, quando esse sistema é sinterizado em uma atmosfera apropriada, a densidade pode exceder 99,9%.

Em estudo recente de Yang e colaboradores (2003), é mostrada a influência do Yb_2O_3 (óxido de íterbio) como aditivo em cerâmicas porosas à base de nitreto de silício, onde houve baixa sinterabilidade para um tipo de Yb_2O_3 , além de excelentes propriedades mecânicas obtidas através da otimização das condições de sinterização e quantidade de aditivos. A Figura 2.3 mostra os intervalos de temperatura de transformação para os óxidos de alumínio.

Muitos dos íons citados anteriormente estabilizam a porosidade e a área superficial específica da alumina em transição, prevenindo a transformação em alumina alfa, uma vez que a transformação para alumina alfa repõe a microporosidade e mesoporosidade da alumina em transição com macroporos interconectados, o que reduz a área superficial específica para menos de $5 \text{ m}^2/\text{g}$ (BAGWELL e MESSING, 1996).

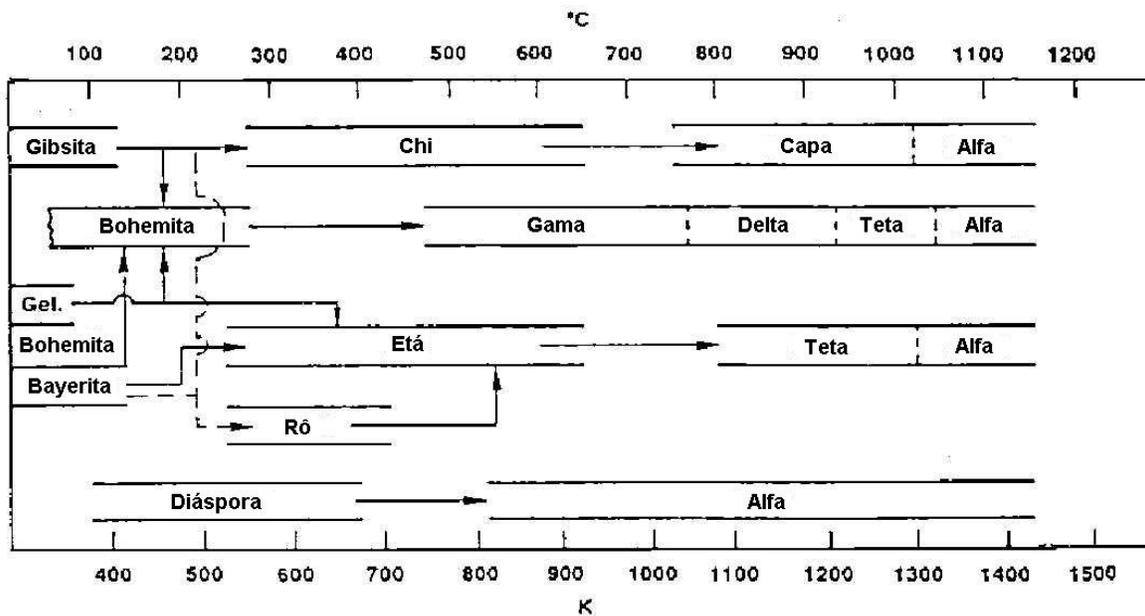


Figura 2.3 – Intervalos de temperatura de transformação para óxidos de alumínio (BAGWELL e MESSING, 1996).

A Tabela 2.5 mostra o efeito dos componentes químicos na perda de área superficial específica na alumina.

Observa-se que há três possibilidades de efeito sobre a área superficial específica: os elementos podem estabilizar, acelerar ou simplesmente não ter efeito algum. Os que estabilizam e aceleram aparecem aproximadamente na mesma quantidade.

Tabela 2.5 – Efeito dos componentes químicos na perda de área superficial específica na alumina (BAGWELL e MESSING, 1996).

| Elemento | Efeito na perda de área superficial específica | Elemento | Efeito na perda de área superficial específica |
|-----------------|---|-----------------|---|
| Be | Estabiliza | Cu | Acelera |
| B | Acelera | Zn | Acelera |
| F | Acelera | Ga | Acelera |
| Na | Acelera | Sr | Estabiliza |
| Mg | Acelera | Y | Acelera |
| Si | Estabiliza | Zr | Estabiliza |
| P | Estabiliza | Mo | Acelera |
| K | Acelera | In | Acelera |
| Ca | Estabiliza | Ba | Estabiliza |
| Sc | Estabiliza | La | Estabiliza |
| Ti | Acelera | Ce | Estabiliza |
| V | Acelera | Pr | Estabiliza |
| Cr | Estabiliza | Nd | Estabiliza |
| Mn | Acelera | Sm | Nenhum |
| Fe | Acelera | Yb | Nenhum |
| Co | Acelera | Th | Estabiliza |
| Ni | Nenhum | | |

2.9.4. Efeito da temperatura:

Para a alumina, a temperatura de sinterização se situa entre 1500°C e 1800°C, dependendo da energia de superfície, da distribuição de tamanho do grão e dos aditivos utilizados. Em trabalho citado por Nogueira (NOGUEIRA, 1992), foi mostrado que para um tempo constante de sinterização, a densidade das peças cerâmicas aumenta proporcionalmente ao aumento da temperatura. Qualquer pequena alteração na temperatura

influencia a sinterização de forma significativa, pois todos os métodos de transporte de massa acima citados variam exponencialmente com a temperatura.

Em trabalho realizado por Flinn e colaboradores (2000), foi estudada a evolução do tamanho do defeito e resistência de aluminas porosas durante a sinterização. A temperatura utilizada neste trabalho variou de 1050°C a 1350°C, Flinn e colaboradores. (2000) concluíram que o tamanho do maior defeito causado por poros evolui de uma forma aproximadamente linear governado por retração macroscópica.

Hardy e Green (1995) investigaram a influência das propriedades mecânicas de alumina com 20 – 40% de porosidade em um intervalo de temperatura de 800°C a 1600°C, concluindo que o módulo de Young, a resistência e a tenacidade à fratura possuem comportamento similar como função do grau de sinterização. Em temperaturas abaixo de 1050°C, estas propriedades mecânicas mudaram com uma densificação mínima, sendo considerado como devido ao crescimento do pescoço e difusão da superfície.

Lopes, Monteiro e Santos (1999) mostraram a redução na porosidade de hidroxiapatita reforçadas com vidro à medida que houve um aumento na temperatura de sinterização.

2.10. Cálculo da porosidade:

A porosidade está quase sempre presente em materiais cerâmicos sinterizados. Durante a sinterização, os poros inicialmente presentes na cerâmica podem mudar de forma, tornando-se canais ou esferas isoladas, sem necessariamente mudar de tamanho. Mais comumente, entretanto, tanto o tamanho quanto a forma dos poros são alterados durante o processo de sinterização. Os poros tornam-se muito menores e mais esféricos à medida que a sinterização continua. Como as partículas se fundem, poros intrapartículas, ou vazios, podem ser transformados em poros interpartículas (SHIELDS, 1991).

A porosidade é definida como a fração de volume de poros presentes. A quantidade de porosidade presente em um material cerâmico pode variar de zero a mais que 90% do volume total. Em uma peça compactada de pó, o volume de vazios, V_V , que é o volume não ocupado por sólidos, pode ser utilizado para definir a porosidade p como:

$$p = \frac{V_v}{V_v + V_s} \quad \text{Equação (2.2)}$$

onde V_s é o volume ocupado apenas pelo sólido, e $V_v + V_s$ representa o volume total da peça. O volume de um sólido é aberto a várias interpretações devido à possível existência de diferentes tipos de poros (vazios). As partículas individuais podem conter poros (intrapartículas) que são ou abertas à superfície (porosidade aberta) ou totalmente fechada com a partícula (porosidade fechada). Além disso, vazios interpartículas podem estar presentes em uma peça sólida, dependendo do grau de empacotamento.

Esses dois tipos de porosidade (aberta e fechada) podem ser utilizados para descrever um sólido. Como os poros fechados, ou cegos, usualmente não podem ser detectados, a porosidade geralmente é caracterizada como aberta, ou aparente, o que descreve aqueles poros que têm contato com a superfície.

Deve ser enfatizado que a porosidade final ou total inclui tanto poros abertos quanto fechados. A porosidade aparente não é tão fácil de medir experimentalmente (comparada com a porosidade fechada), mas é mais importante porque ela afeta diretamente certas propriedades como permeabilidade, impermeabilidade ao vácuo e disponibilidade de superfície para reações catalíticas. Os poros fechados têm pouco ou nenhum efeito nessas propriedades por causa da sua falta de acessibilidade (SHIELDS, 1991).

Antes da sinterização, quase toda a porosidade de um material cerâmico é representada por poros abertos. Durante o processo de queima, a porosidade da amostra diminui. Alguns poros abertos são totalmente eliminados e alguns são transformados em poros fechados. Como resultado, a fração de volume de poros fechados cresce inicialmente e depois decresce por volta do final do processo de sinterização.

A porosidade aberta é geralmente eliminada quando a porosidade diminui de cerca de 5% do seu valor inicial. À medida que 95% do volume teórico da amostra é atingido, a cerâmica é impermeável ao gás, ou seja, a porosidade aberta foi essencialmente eliminada.

2.11. Porosidade aberta:

Há dois métodos experimentais comumente utilizados para determinar a porosidade: porosimetria por mercúrio e sorção de vapor.

2.11.1. Técnicas de caracterização de cerâmicas porosas:

2.11.1.1. Porosimetria por mercúrio:

Desde o desenvolvimento do primeiro porosímetro de mercúrio em 1945, essa técnica tem se tornado um método estabelecido para a determinação de porosidade aberta em materiais porosos. Segundo Reed (1986), o mercúrio não molha a maioria dos materiais cerâmicos, e a pressão deve ser aplicada para forçá-lo para dentro de um poro superficial com vácuo. Ainda, um porta-amostras especial é parcialmente preenchido com uma amostra seca, feito vácuo, e então preenchido com mercúrio. A pressão aplicada ao mercúrio causa a penetração de poros muito maiores que um tamanho particular.

A base desse método é a equação de Washburn (Equação 2.3), que relaciona a pressão, P , necessária para forçar o mercúrio para dentro dos poros de raio r , assumindo-se que a geometria do poro é cilíndrica:

$$Pr = -2\gamma \cos \theta \quad \text{Equação (2.3)}$$

Nessa equação, a tensão de superfície e o ângulo de contato do mercúrio com as paredes do poro são expressos como γ e θ , respectivamente. A equação de Washburn é derivada igualando a força que expulsa o mercúrio de um poro com a força associada com a pressão que intrude o mercúrio para um poro (SHIELDS, 1991).

Os dados obtidos pela intrusão de mercúrio para dentro de um poro podem ser reduzidos para proporcionar as seguintes funções:

- Percentual de volume de poros plotado em função da pressão e / ou raio do poro;

- Derivada dos dados cumulativos de pressão – volume, expressada como dV / dP em função da pressão e / ou raio do poro;
- Tamanho do poro ou função de distribuição do volume, $D_v (r)$, que é a mudança de volume (dV) de mercúrio intrudido por unidade de mudança no raio do poro (dr), e é calculada pela equação 6;
- Área específica de poro interpartículas e intrapartículas, que é calculada pela equação 7 e a distribuição de área específica de poro [$D_s (r)$], ou a área específica por unidade de raio de poro, pode ser obtida da distribuição de tamanho de poro, como mostra a equação 8.

$$D_v(r) = \frac{P^2}{2\gamma \cos \theta} \left(\frac{dV}{dP} \right) \quad \text{Equação (2.4)}$$

$$S = \frac{1}{\gamma \cos \theta} \int_0^v P dV \quad \text{Equação (2.5)}$$

$$D_s(r) = \frac{2D_v(r)}{r} \quad \text{Equação (2.6)}$$

Embora a forma das curvas de intrusão dependa do tamanho e volume dos poros, um aspecto característico de quase todas as curvas de porosimetria é que elas exibem um levantamento de mercúrio a baixas pressões assim que o mercúrio entra nos vazios interpartículas muito grandes, seguido por intrusão para dentro de poros intrapartículas muito menores a altas pressões.

Há limitações na utilização do porosímetro por mercúrio. A primeira limitação é que a equação de Washburn se refere ao cálculo de tamanho de poros assumindo que os poros são cilíndricos. Isto pode não refletir suas geometrias verdadeiras. Outra limitação é que, ao se assumir um valor para o ângulo de contato na equação 5, simplifica-se a parte experimental, mas pode-se introduzir um erro.

Entretanto, a disponibilidade de medidores de ângulo comerciais para medição do ângulo de contato do mercúrio em uma superfície sólida elimina a necessidade de se fazer

uma suposição. Por outro lado, uma limitação potencial é imposta pelas variações possíveis no ângulo de contato e a tensão superficial sob um intervalo muito extenso de pressões, variando de pressões menores que a ambiente até 414 MPa.

Uma terceira limitação do porosímetro por mercúrio é a possível influência de pressão alta na amostra. Felizmente, muitos materiais sólidos possuem tais características de baixa compressibilidade cujo efeito é desprezível. Entretanto, alguns sólidos muito macios podem mostrar uma compressão apreciável a altas pressões, o que poderia ser interpretado como uma falsa intrusão de mercúrio.

Finalmente, devido aos porosímetros comerciais terem um limite superior de 414 MPa, o limite inferior dos poros para os quais o mercúrio pode entrar é de aproximadamente 1,7 nm em raio. Portanto, poros muito pequenos devem ser estudados usando-se uma técnica diferente (SHIELDS, 1991). Esta técnica mede tamanho de interconexões entre poros, e não diâmetro de poros especificamente.

2.11.1.2. Sorção de gás:

Há dois tipos de interações de adsorção entre gases e sólidos. A adsorção química envolve interações químicas fortes entre um gás (adsorvante) e o sólido (adsorvente). A medição da adsorção química é particularmente importante para a caracterização de catalisadores. A adsorção física envolve forças de Wan der Waals, similares as da liquefação de vapores. Uma técnica extensamente utilizada para determinar a porosidade é baseada na adsorção física e subsequente dessorção de um adsorvante na superfície de um adsorvente. O método de sorção de vapor não é apenas utilizado para medir distribuições de tamanho de poros, mas também é a base para determinação da área específica.

Quando o adsorvente (sólido) pode interagir com um vapor adsorvante, tipicamente nitrogênio a baixas temperaturas, uma quantidade de vapor irá adsorver fisicamente na superfície e nos poros como uma função da pressão parcial do vapor.

Estudos de sorção levam a cálculos do tamanho de poros e distribuições de tamanhos de poros fazendo uso da equação de Kelvin:

$$\ln\left(\frac{P}{P_0}\right) = -\frac{2\gamma\bar{V}\cos\theta}{rRT} \quad \text{Equação (2.7)}$$

que relaciona a pressão de vapor de equilíbrio, P , de uma superfície curvada, semelhante àquelas de um líquido em um capilar ou poro de raio r , com a pressão de equilíbrio, P_0 , do mesmo líquido em uma superfície plana.

Os termos restantes, γ , \bar{V} , θ , R e T , representam a tensão superficial, o volume molar, o ângulo de contato do adsorvente, a constante das fases e a temperatura absoluta, respectivamente. De acordo com a equação de Kelvin, um vapor irá condensar para dentro dos poros de raio r quando a igualdade expressa na equação é obtida.

Devido ao ângulo de contato do nitrogênio ser praticamente zero, o vapor condensa em pressões relativas P / P_0 substancialmente menores que um. A quantidade de vapor que irá adsorver em uma superfície sólida é uma função da temperatura, pressão e do potencial de interação entre a adsorvente e o adsorvente. Um gráfico da quantidade de vapor adsorvido ou dessorvido versus pressão à temperatura constante é chamado de isoterma. Uma isoterma típica é mostrada na Figura 2.4 (SHIELDS, 1991).

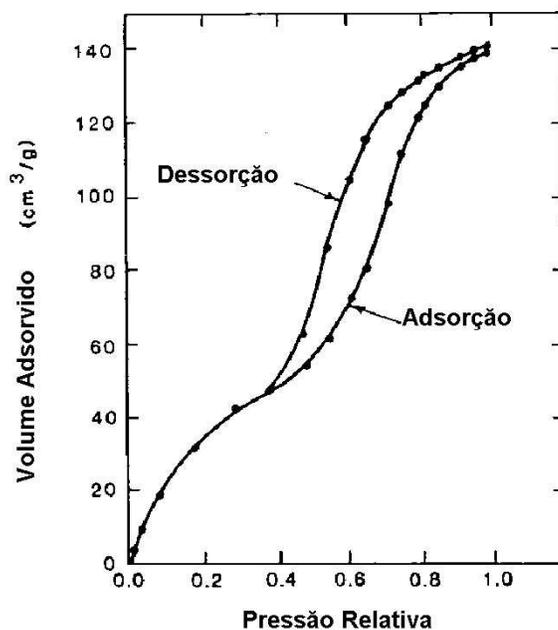


Figura 2.4 – Adsorção e dessorção criogênica de nitrogênio em um pó de alumina a 77,4 K (REED, 1986).

Os cálculos do tamanho de poros de uma isoterma de dessorção são geralmente finalizados em uma pressão relativa de 0,3, ou mesmo com pressões mais altas, se a reversão da histerese entre as curvas de adsorção e de dessorção está fechada, uma indicação da ausência de poros abaixo daquela pressão relativa.

Abaixo das pressões relativas de 0,3, a validade da equação de Kelvin é questionada devido à incerteza no valor da tensão superficial, ao ângulo de contato e ao volume molar do adsorvante quando apenas um ou dois diâmetros moleculares estão presentes nos poros.

Devido a uma pressão relativa de 0,3 corresponder a poros de aproximadamente 1,5 nm de raio, esse tamanho representa o limite inferior que deveriam ser calculados da equação de Kelvin. Entretanto, a caracterização de micro-porosidade (poros muito menores que 1,5 nm) por adsorção de gás é possível por utilização de qualquer uma das várias teorias, tais como o método $-t$ e o método $-\alpha_s$.

As medições da distribuição do tamanho de poros na equação de Kelvin são limitadas a raios de poro muito menores que 100 nm. A técnica de porosimetria por mercúrio, em contraste, tem a capacidade de medir o volume de poros com raios tão grandes quanto várias centenas de micrômetros (SHIELDS, 1991).

Os dados obtidos por sorção de nitrogênio refletem o comportamento agregado de uma rede porosa como um todo. Um modelo da rede porosa é necessário para extrair informações estruturais desses dados.

Vários modelos simples são freqüentemente utilizados para analisar os dados de sorção de nitrogênio e porosimetria por mercúrio, como os feixes de tubos paralelos simples, que assume que os poros comportam-se como se eles fossem independentes uns dos outros e individualmente conectados com a superfície.

Este é o modelo típico utilizado em *softwares* padrões que acompanham os equipamentos que calculam a área superficial, o volume em poro e a distribuição de tamanho de poro (LEE *et al.*, 1996).

2.12. Porosidade fechada:

Devido aos poros “cegos”, isto é, aqueles que não tocam a superfície, serem inacessíveis a fluidos, as técnicas de porosimetria por mercúrio e adsorção de gás não podem detectá-los.

Se há suspeita da presença de poros fechados, a amostra deve ser pulverizada para tentar removê-los. No evento em que os poros tornaram-se fechados durante o processo de queima, uma comparação da densidade verdadeira (teórica) antes e depois da sinterização daria uma indicação da quantidade de poros fechados. Após sinterização, uma cerâmica usualmente atinge um valor muito maior que 95% de densidade teórica. Assim, o volume de poros fechados é muito pequeno (SHIELDS, 1991).

2.13. Hierarquia dos impactos da porosidade nas propriedades:

A presença de porosidade e micro-trincas afeta as propriedades mecânicas dos materiais cerâmicos. A Tabela 2.6 mostra a hierarquia das categorias de dependência da porosidade por parte das propriedades.

Segundo Rice (RICE, 1998), considerações básicas e simples mostram que há três categorias grosseiras da dependência da porosidade que aumentam em sua complexidade de dependência em uma mostra hierárquica.

No nível mais baixo, há propriedades que não possuem dependência com a porosidade; tipicamente, essas são aquelas que dependem apenas da ligação atômica local e não são afetadas por ruptura de intervalo grande dessas pelos poros.

Assim, propriedades tais como volume da célula unitária recaem nessa primeira categoria, assim como temperaturas de fusão e ebulição, energia de desgaste e emissividade. Uma extensão importante dessas propriedades determinadas por ligações atômicas para o comportamento macroscópico que não depende da porosidade é a expansão térmica.

Tabela 2.6 - Hierarquia das categorias de dependência da porosidade por parte das propriedades (RICE, 1998).

| Categoria / nível de dependência da porosidade | Exemplos de propriedades / utilizações |
|--|--|
| 1) Nenhuma dependência da porosidade | Parâmetros de rede, volume da célula unitária, expansão térmica, emissividade. |
| 2) Dependência apenas da fração de porosidade | Densidade, muitos dados de constante dielétrica, capacidade térmica por unidade de volume. |
| 3) Dependência tanto da fração quanto do caráter da porosidade | |
| a) Fluxo ou tensão predominante na fase sólida | Propriedades mecânicas, condutividades elétrica e térmica a baixas temperaturas e porosidade (muito fina). |
| b) Todo fluxo na fase porosa e filtração | Área específica e tortuosidade, por exemplo, para catalisadores. |
| c) Fluxo tanto nos poros quanto na fase sólida | Condutividade térmica, com poros muito grandes e abertos a temperaturas muito altas. |

A segunda categoria hierárquica consiste naquelas propriedades dependentes da quantidade de porosidade, e não do caráter. Essa categoria inclui propriedades dependentes apenas da massa em um dado volume, isto é, de sua distribuição com o volume. Isto inclui a densidade, capacidade térmica (por volume) e muitos dados de constante dielétrica.

Tais propriedades seguem uma relação de misturas para as frações volumétricas da fase porosa (P) e da fase sólida (1-P):

$$X = X_s(1-P) + X_p(P) \quad (2.8)$$

onde X é a propriedade do corpo, X_s é a propriedade do sólido (isto é, quando $P = 0$) e X_p é a propriedade da fase porosa (frequentemente zero, mas não sempre, por exemplo, tipicamente próximo de 1 para o índice refrativo e constante dielétrica). A terceira, maior,

mais complexa e mais importante categoria consiste naquelas propriedades dependentes tanto da quantidade como do caráter da porosidade. Três subitens importantes desta são: a) propriedades determinadas apenas por transmissão de fluxo ou tensão através da fase sólida, mas não através da porosa, b) propriedades determinadas apenas pelo fluxo através da fase porosa (por exemplo, filtração), e c) propriedades dependentes da transmissão através das fases sólida e porosa.

A classificação em categorias das propriedades assume que os poros estão vazios ou contêm um fluido cujas propriedades não são significativamente diferentes daquelas no vácuo. Corpos com fluidos, por exemplo, água ou soluções, não apresentando esse critério devem ser tratadas como compósitos para propriedades onde eles interfiram significativamente (RICE, 1998). É importante notar que algumas propriedades podem mudar de categoria com a natureza da porosidade ou das condições. Assim, muitas propriedades, incluindo muitas ou todas as propriedades mecânicas e condutivas, de corpos com poros tubulares alinhados paralelamente com o eixo de tensão ou fluxo seguem uma dependência do tipo $1 - P$, que é aquela para as propriedades da categoria 2 (e o limite superior de dependência de porosidade das propriedades).

Propriedades mecânicas e condutivas de outras estruturas de poros caem todas abaixo da dependência $1 - P$, isto é, têm grandes taxas de decaimentos da propriedade, tipicamente uma mostra não linear em intervalos razoáveis de P .

A constante dielétrica dos corpos com porosidade substancial fina, material com constante dielétrica alta, ou ambos, diverge abaixo da relação da regra das misturas (aparentemente quando as cargas da superfície dos poros tornam-se significantes) movendo-se da categoria 2 para a categoria 3.

Similarmente, os poros tem efeito desprezível na absorção ótica. Porém, quantidades significativas de poros próximos ao tamanho ótimo para espalhamento ótico podem aumentar a absorção ótica total devido ao comprimento aumentado do caminho ótico do espalhamento.

Em baixas temperaturas e porosidade muito fina e fechada, onde as transferências de calor por convecção e radiação através e entre os poros são insignificantes, a condutividade térmica classifica-se na categoria 3a; entretanto, assim que a temperatura e o tamanho, quantidade e abertura dos poros aumenta, a condutividade térmica passa para a

categoria 3c, e a altas temperaturas e porosidade, esta pode atingir a categoria 3b devido ao transporte térmico por radiação.

Há também uma hierarquia de dependências das propriedades para micro-trincas, que são de interesse como um extremo de poros para a sua ocorrência em um número de materiais, e para seu uso para modificar propriedades, por exemplo, a tenacidade e resistência ao choque térmico mais extremo.

A hierarquia para micro trincas possui certa similaridade com a da porosidade, mas com algumas diferenças. Há as mesmas três categorias básicas, com muitas semelhanças, onde as propriedades pertencem às mesmas categorias.

Assim, as propriedades da categoria 1, isto é, as não dependentes das micro-trincas, incluem muitas propriedades determinadas apenas pelas ligações atômicas locais, tais como dimensões da célula unitária e densidade teórica; entretanto, uma diferença importante entre a dependência das propriedades por parte de porosidade e micro-trinca é que a expansão térmica está na categoria 2 (e em alguns casos, na categoria 3) para as micro-trincas, enquanto que para a porosidade, ela está na categoria 1 (na ausência de micro trincas).

Para ambas as hierarquias, a densidade final é uma propriedade da categoria 2 (embora com muito menos diminuição com o aumento da micro-trinca versus conteúdo do poro). As propriedades da categoria 3 apresentam são as que apresentam maiores semelhanças e diferenças, com relação às demais categorias, para as dependências das propriedades por parte de porosidade e micro trinca.

Assim, as propriedades mecânicas e de condução mostram, ambas, dependências significantes tanto na quantidade de porosidade e micro-trinca quanto ao seu caráter, com o último envolvendo os mesmos parâmetros geométricos de forma e empilhamento, isto é, orientação e distribuição espacial tanto para os poros quanto para as micro trincas.

As diferenças mais significantes entre as duas hierarquias é que as medidas das propriedades dos tipos presentes nas categorias 3b e 3c para as micro-trincas são mais restritas devido ao pequeno volume de micro-trincas, e especialmente devido à natureza comum discreta, isto é, não interconectada, produzindo, assim, percolação limitada ou inexistente (RICE, 1998).

2.14. Modelos básicos de aproximações para as propriedades mecânicas:

2.14.1. Modelos baseados na tensão:

Há dois modelos básicos de aproximação para as propriedades mecânicas: modelo de tensão – deformação local e modelo de capacidade de carga ou de base sólida de área de seção transversal. Estas podem ser avaliadas em escala global (como uma média) ou, mais freqüentemente, em uma escala local de poros (RICE, 1996).

O modelo mais extensivamente desenvolvido para tensão – deformação local é baseado em um conceito originariamente para compósitos, onde cada corpo poroso a ser analisado é reconstruído através de balões sólidos do mesmo material do corpo.

Esses balões possuem um intervalo infinito de tamanhos, mas com cada balão tendo porosidade P semelhante ao do corpo a ser analisado. Assume-se que os balões muito finos podem preencher totalmente todos os interstícios entre os balões maiores de tal forma que a única porosidade na amostra reconstruída deve-se a um poro centrado em cada balão.

Assume-se também que a pressão aplicada a esta amostra reconstruída é uniformemente distribuída em torno de cada poro nos balões, de modo que as deformações podem ser rigorosamente calculadas para a obtenção dos módulos de compressão e os módulos de cisalhamento calculados ou estimados, pelos quais os módulos de Young e as razões de Poisson podem, pelo menos, ser restringidos.

Para as propriedades elásticas, há a questão básica da extensão dos efeitos das concentrações de tensão. Assim, a menos que houvesse deformação plástica local em alguns casos (por exemplo, metais, alguns polímeros e cerâmicas em altas temperaturas) e não em outros (por exemplo, cerâmicas em geral em intervalos de temperatura de trabalho), deveria não haver efeitos intrínsecos de concentrações de tensão nas propriedades elásticas uma vez que essas permanecem lineares para altos níveis de resistências teóricas.

Contudo, as concentrações de tensão continuam sendo importantes para os modelos de porosidade – propriedades elásticas devido em parte ao fato das concentrações de tensão parecem ser um fator lógico em algumas propriedades mecânicas, especialmente resistências. Mas, mesmo para essas propriedades onde as concentrações de tensão são isoladas, e com isso torna-se uma situação mais fácil, há três questões básicas referentes à aplicabilidade das concentrações de tensão:

- 1) Não há concentrações de tensão para tensões paralelas com poros cilíndricos alinhados de qualquer forma de seção transversal. Entretanto, há uma redução nas propriedades, em proporção à redução de área, apesar da ausência de tais concentrações. Isto permite uma base de área para modelagem e seriamente questiona uma função de controle de concentrações de tensão;
- 2) A questão de se a concentração de tensão média máxima ou integrada é muito importante. Enquanto a concentração máxima é importante, há componentes compressivos que reduzem muito as concentrações médias;
- 3) O fato de que os picos de concentrações de tensão variam significativamente com o estado de tensão, por exemplo, eles são menores partindo de flexão uniaxial para tensão verdadeira, para tensão biaxial e para compressão uniaxial.

Segundo Rice (RICE, 1996), várias análises foram realizadas e constatou-se que não há evidência que os efeitos da porosidade variam com diferentes concentrações de tensão de diferentes estados de tensão. De fato, em um caso de efeitos da porosidade nas propriedades mecânicas depender possivelmente do estado da tensão, isto é, resistência à tração versus resistência à compressão, as tendências são opostas àquelas para correlação com concentrações de tensão.

Assim, apesar de baixas concentrações de tensão em carregamento compressão versus tração, o último dá uma dependência igual ou maior da porosidade. Além disso, enquanto há alguma correlação entre as concentrações de tensão nos poros e dependência da porosidade nas propriedades elásticas, há desvios significativos, onde o modelo da área sólida mínima fornece resultados mais consistentes.

De modo geral, os modelos baseados em tensão não têm mostrado direção para porosidades mistas ou de diferentes tamanhos, além de mostrar menos precisão para compósitos, no qual o modelo foi desenvolvido.

2.14.2. Modelos da área sólida mínima:

A transição de porosidade aberta – fechada não é particularmente importante para as propriedades mecânicas e condutivas, mas é crítica para aplicações baseadas na superfície de área, fluxo e permeabilidade. Os valores de porosidade fechada (P_C) são de larga importância para todas as aplicações (RICE, 1998).

Uma questão básica, mas que raramente é abordada, é que os parâmetros úteis para propriedades dependem da característica da porosidade. Parâmetros como a quantidade ou grau de porosidade aberta e fechada, o número de coordenação, tamanho e forma dos poros e área sólida mínima são, em geral, sugeridos para a realização de trabalhos e, até meados de 1996, ainda não havia uma avaliação sistemática de quais desses eram parâmetros práticos e apropriados.

Contudo, a utilização de modelos idealizados (isto é, corpos de empilhamento regular de partículas ou poros esféricos uniformes) mostra que desses parâmetros, apenas os da área sólida mínima e forma de poro abrangem todas as características necessárias (RICE, 1996). A Figura 2.5 mostra esquematicamente a razão e definição da área sólida mínima (MSA).

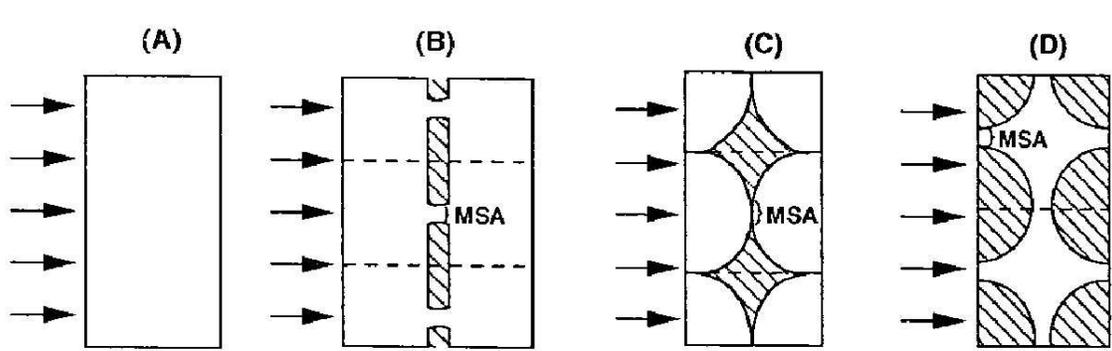


Figura 2.5 – Ilustração esquemática da razão e definição da área sólida mínima (MSA). (A) amostra uniforme em que uma tensão uniforme ou fluxo de elétrons ou fônons incide sobre ela; (B) amostra com poros isolados (com manchas) onde a área sólida mínima é definida, e claramente é o fator principal que controla a transmissão de tensão ou fluxo; (C) e (D) respectivamente, a MSA para amostras idealizadas respectivamente de partículas esféricas uniformes conectadas e uma espuma idealizada (as áreas com manchas são os poros) (RICE, 1996).

A área de seção transversal sólida normal à direção de referência deve claramente correlacionar-se com muitas propriedades mecânicas, bem como com aquelas de condução através da fase sólida. Tanto a área sólida mínima quanto à sólida média devem ser consideradas (que são as mesmas para a direção de referência normal a seções transversais de poros prismáticos e cilíndricos, por exemplo).

Entretanto, geralmente assume-se que as áreas de seção transversal de interesse e controle são a área sólida mínima, ao invés da área sólida média. Vários modelos têm sido desenvolvidos ao longo dos anos para diversas geometrias idealizadas de poros, assumindo que as propriedades mecânicas correlacionam-se diretamente com as áreas sólidas mínimas calculadas (devido à geometria, assumindo-se poros de tamanho, forma e empilhamento uniformes da forma selecionada).

2.15. Modelagem dos efeitos da porosidade e micro-trinca nas propriedades físicas:

A modelagem dos efeitos da porosidade nas propriedades físicas é um assunto extenso e complexo devido à grande diversidade de caráter de poro. Enquanto há uma variedade de aproximações de modelagem para as quais não se pode categorizar perfeitamente, muitos modelos podem ser vistos como sendo predominantemente em uma das três categorias: 1) totalmente empírica; 2) mecânica; e 3) geométrica, especialmente aqueles baseados na área sólida mínima (MSA).

O primeiro dos três grupos de desafios em avaliar os modelos de porosidade é o seu número e diversidade. O segundo grupo trata das incertezas e variações na aplicabilidade dos modelos, uma vez que muitos modelos, especialmente os mecânicos, são modificados ou aplicados de uma forma para um propósito particular tendo pouca ou nenhuma relação para aquela de sua derivação.

O terceiro desafio é que a qualidade dos dados versus os modelos que devem ser avaliados é freqüentemente não tão bom quanto eles deveriam aparentar, por exemplo, baseado no seu espalhamento, devido a erros sistemáticos e desprezados (principalmente provenientes da heterogeneidade e anisotropia). Assim, é essencial que as avaliações sejam baseadas em comparações compreensivas de dados com modelos individuais, cujos ajustes são, por sua vez, comparados (RICE, 1998).

Inicialmente, a avaliação da dependência da porosidade em relação às propriedades elásticas foi primeiramente empírica, com trabalho substancial em materiais metálicos. O gráfico das propriedades em função da densidade era um procedimento comum para ganhar discernimento sobre os efeitos da porosidade e para extrapolação para outros regimes de porosidade.

As utilizações da densidade relativa (percentual ou fração da densidade teórica) ou o percentual da fração volumétrica da porosidade (P) são preferíveis uma vez que todos os gráficos são normalizados para uma escala de 0 a 1. Similarmente, confeccionar um gráfico do percentual ou fração da propriedade relativa para seu valor em $P=0$ (se conhecido com suficiente exatidão) é também útil.

O uso de gráficos lineares é útil porque o intervalo de baixa porosidade freqüentemente varia, pelo menos aproximadamente, de forma linear; entretanto, muitos dados em intervalos de P muito grandes (especialmente com níveis muito altos de P) mostram substancial diminuição não linear da propriedade com o aumento da porosidade.

Assim, gráficos do tipo semilogaritmo do logaritmo da propriedade absoluta ou relativa em função de P em uma escala linear nos dá uma linha reta para níveis muito altos de P do que os gráficos lineares (freqüentemente o intervalo completo de P comumente investigado, por exemplo, para $P < 0,5$).

O uso desses tipos de gráfico e a relação exponencial resultante, e^{-bP} , onde b é a inclinação do semi-log da dependência da propriedade sob o intervalo inicial de porosidade para linearidade em um gráfico do tipo semi-log foi primeiro mostrado por Duckworth na discussão do artigo de Ryskewitch sobre resistência à compressão em aluminas e zircônia porosas (RICE, 1998).

Gráficos do tipo log – log de propriedades versus porosidade têm sido também comumente utilizados, de novo baseado inicialmente em uma base puramente empírica, uma vez que eles também permitem apresentação fácil de um intervalo largo de dados. Tais gráficos são também comumente lineares, (para o intervalo comum de P), levando a relações para a dependência da porosidade da forma $(1 - AP)^n$, que também é a forma comum para vários modelos mecânicos e de outros tipos. Geralmente, A é considerado como 1, mas mais recentemente tem sido freqüentemente tomado como $1/P_C$. Há três conclusões com o uso dos gráficos log – log:

1. Extrapolação precisa para $P=0$, ou em P ou $P/P_C=1$ (dependendo se a abscissa é P ou P/P_C , ou $1-P$ ou $1-P/P_C$), uma vez que tais gráficos nunca vão para o zero;
2. Eles seriamente obscurecem a transição para valores de P_C (em parte por causa de 1);
3. Eles são de uso duvidoso em interpolação entre vários modelos (em parte porque gráficos log – log sob substanciais intervalos de P não são lineares).

2.16. Aproximações estatísticas para materiais frágeis

Muitas das propriedades mecânicas das cerâmicas podem ser decorrentes da dificuldade de movimento de discordâncias em suas estruturas cristalinas tipicamente de ligações iônicas e covalentes, onde a ausência de movimento de discordâncias e, conseqüentemente, ausência de deformação plástica, causa a ruptura da maioria das cerâmicas monolíticas de maneira frágil, com baixa energia de absorção (JOHNSON e TUCKER, 1991).

Como apenas a deformação elástica está disponível para acomodar as tensões de extremidades de trincas, as condições de estabilidade de trincas são definidas pelo critério de Griffith / Orowan, onde a tensão de fratura é inversamente proporcional à raiz quadrada do tamanho do defeito.

Essa relação de raiz quadrada inversa, combinada com os tamanhos não uniformes dos defeitos que são inevitáveis em materiais cerâmicos, resulta em duas observações: (a) observações múltiplas de resistência à fratura em amostras similares geralmente incluem muito de espalhamento ou variabilidade sobre a resistência média, e (b) a resistência média é uma função do tamanho da amostra uma vez que amostras muito grandes possuem baixa resistência que amostras muito pequenas (JOHNSON e TUCKER, 1991).

Descrições quantitativas da dependência da resistência com a variação e tamanho dos defeitos são necessárias para componentes estruturais de projetos cerâmicos, a fim de prever a reprodutibilidade do componente e para comparar os méritos de diferentes materiais cerâmicos para uma dada aplicação.

Uma dessas formas de descrição quantitativa é de natureza estatística da fratura em materiais frágeis e recaem em uma função de distribuição para definir a probabilidade cumulativa de falha como uma função de todas as variáveis dependentes que influenciam a falha (JOHNSON e TUCKER, 1991).

Uma aproximação alternativa é caracterizar o comportamento de um número grande de amostras do mesmo material e usar uma aproximação estatística para projeto. Há diversos modelos estatísticos e probabilísticos propostos para a interpretação de resultados de amostras cerâmicas, porém a função de distribuição de Weibull é a mais utilizada (FERNANDES *et al.*, 1989).

2.16.1. Distribuições de Weibull:

A distribuição de Weibull tornou-se muito popular nas descrições de fratura de materiais cerâmicos por várias razões: a função é matematicamente simples e fácil de manusear. Mas, não menos importante, esta distribuição obteve sucesso em descrever muitos dados de fratura de vários materiais cerâmicos em investigações diferentes (JOHNSON e TUCKER, 1991).

A distribuição de Weibull, que é uma distribuição semi empírica de dois parâmetros, é dada por:

$$f(x) = m(x)^{m-1} \exp(-x^m) \quad (2.9)$$

onde $f(x)$ é a frequência de distribuição da variável aleatória x e m é o fator de forma, usualmente referido como módulo de Weibull (BARSOUM, 1997). A Figura 2.7 mostra o gráfico gerado pela função de distribuição de Weibull.

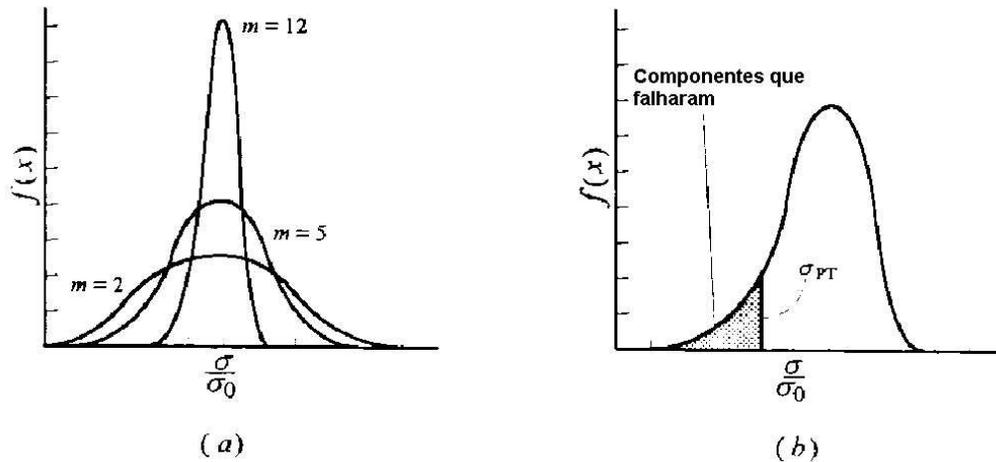


Figura 2.7 – Gráficos gerados pela distribuição de Weibull. (a) O efeito de m na forma da distribuição de Weibull. À medida que m aumenta, a distribuição estreita-se; (b) Truncamento da distribuição de Weibull como resultado do teste de ensaio (BARSOU, 1997).

Uma vez que se trabalhe com uma distribuição de resistência, a variável aleatória x é definida como σ/σ_0 , onde σ é a tensão de falha e σ_0 é o parâmetro de normalização.

2.16.2. Fatores que afetam o módulo de Weibull:

Para fatores de projeto é importante ter altos valores do módulo de Weibull. Tal valor não deveria ser confundido com relação à resistência, uma vez que é possível ter uma amostra pouco resistente com um alto valor de m e vice versa. Por exemplo, um sólido com defeitos grandes e de tamanhos idênticos, seria pouco resistente, mas, em princípio, exibiria m grande. Para obter valores grandes de m , deve-se observar alguns parâmetros críticos, tais como a uniformidade da microestrutura, incluindo falhas, tamanho de grão e inclusões (BARSOU, 1997).

Uma das ramificações importantes da falha frágil é o fato que a resistência torna-se uma função do volume, ou seja, corpos de prova muito grandes terão uma maior probabilidade de conter um defeito muito maior, o que, em termos, causará menores resistências. Claramente isto é uma importante consideração quando os dados obtidos nos

corpos de prova, que em geral são pequenos, são comumente utilizados para o projeto de componentes muito grandes (BARSOUM, 1997).

2.17. Engenharia tecidual:

À medida que há uma melhoria na tecnologia aplicada à saúde humana, a expectativa de vida vem aumentando, mas nem todas as partes do corpo podem manter suas funções com o processo de envelhecimento. É preciso que os ossos e a cartilagem apoiem o envelhecimento do corpo, embora as células que os produzem se tornem menos ativas com o tempo. Outros órgãos, tais como os rins, o coração e o fígado devem ser operados para ter um tempo de vida maior (SCHEFFLER e COLOMBO, 2005).

A doença mais comum é a osteoporose, o que causa uma perda de densidade do osso e afeta a todos com o envelhecimento. O osso é um composto natural de colágeno (polímero) e mineral ósseo (cerâmica). O colágeno é formado por cadeias de proteínas de hélice tripla, que possui alta resistência à tração e à flexão. O mineral ósseo é constituído de uma cerâmica à base de fosfato de cálcio (hidroxiapatita), que contribui com a rigidez e resistência à compressão do osso.

Osso cortical é uma estrutura densa com alta resistência mecânica e também é conhecido como osso compacto. Osso trabecular é uma rede de estruturas (trabéculo) envolvendo vazios grandes com porosidade interconectada entre 55 e 70%, que é uma estrutura de suporte. As estruturas do osso trabecular são mais afetadas pela osteoporose.

Esse tipo de estrutura está presente nos finais de ossos longos, tais como o fêmur ou no osso cortical em ossos pequenos. A perda da densidade do osso é causada pela redução numérica de células osteogênicas (osteoblastos) com a idade. O único tratamento para casos severos de juntas com osteoporose é a total substituição da junta (SCHEFFLER e COLOMBO, 2005).

Procedimentos cirúrgicos para o reparo de perda de tecido devido a algum trauma ou extração de tecido doente envolvem implantes de enxerto (transplantes), que podem ser doados de um sítio do mesmo paciente (autoenxerto), de outro ser humano (homoenxerto) ou de outras espécies (xenoenxertos).

Tanto nos homoenxertos quanto nos xenoenxertos, há a possibilidade de transmissão de doenças, o que faz com que haja uma grande demanda para substitutos sintéticos especialmente projetados e fabricados para agir como um *scaffold* (arcabouço tridimensional poroso) na regeneração de tecidos para seu estado natural e suas funções, que é fundamental para a engenharia tecidual (SCHEFFLER e COLOMBO, 2005).

Os *scaffolds* normalmente possuem propriedades osteocondutivas, e raramente propriedades osteoindutivas ou osteogênicas, além de possuírem a grande vantagem de servir de suporte mecânico (BLOM, 2007).

Quando utilizados para regeneração do tecido ósseo, os *scaffolds* podem ser classificados em dois tipos: arcabouços que induzem a migração e o crescimento celular, provenientes de tecidos vizinhos, para a formação de tecido ósseo; arcabouços carreadores de células osteogênicas autógenas, que foram colonizadas em biorreatores e subsequentemente reimplantadas no paciente (BURG; PORTER; KELLAM, 2000).

Eles podem ser de origem natural, como as cerâmicas, a exemplo do coral; sintéticos bioabsorvíveis, como o PGLA (Poli ácido glicólico - ácido lático), caprolactama (CPL) e cerâmicas porosas; ou híbridos (AHSAN; NEREM, 2005; HUTMACHER et al., 2007).

A engenharia tecidual (também chamada de engenharia de tecidos) tem sido desenvolvida para substituir, reparar ou reconstruir tecidos ou órgãos perdidos ou danificados por acidentes ou doenças graves (LANGER, 2000).

Esse processo é relativamente complexo, e por conta disso, a engenharia tecidual é um campo multidisciplinar que envolve a aplicação de princípios e métodos da engenharia e das ciências da saúde para assistir e acelerar a regeneração e o reparo de tecidos defeituosos ou danificados, através de melhorias nas terapias já existentes, (TABATA, 2009; HENCH *et al.*, 2006).

Deste modo, essa ciência visa criar e aprimorar novas terapias e/ou desenvolver novos biomateriais que restaurem, melhorem ou impeçam o agravamento da função tecidual comprometida, o que resulta em redução significativa de custos (KAIGLER; MOONEY, 2001; SACHLOS; CZERNUSZKA, 2003; MARINS *et al.*, 2004).

Vários materiais vêm sendo desenvolvidos para utilização em implantes cirúrgicos e dispositivos médico-odontológicos. Hench (HENCH, 1998) indicou que, devido às

limitações da utilização de enxerto ósseo autógeno, materiais sintéticos para essa aplicação vêm sendo pesquisados com uma alternativa de tratamento e lesões em tecido ósseo. Para isso, são criados suportes de crescimento tecidual (*scaffolds*) que são biorreabsorvíveis.

Os eventos que são esperados que os implantes promovessem nos tecidos vivos são: (a) habilidade de se auto-reparar; (b) capacidade de manutenção do suprimento sanguíneo; e (c) a alteração da sua estrutura em resposta a fatores ambientais.

Espera-se, ainda, que os novos biomateriais possam, através da interação entre biologia e engenharia, promover um reparo tecidual por um tempo mais longo do que a limitada expectativa de vida para os implantes humanos (HENCH *et al.*, 2000).

Dentre os biomateriais que foram desenvolvidos, e vem sendo aperfeiçoados estão alguns polímeros (poli(ϵ -Caprolactona), poli(metacrilato de metila), etc.), cerâmicas (hidroxiapatita), vidros bioativos (Bioglass®), compósitos (Poli(ϵ -Caprolactona) (PCL) e β -Fostato Tricálcico (β -TCP) (SOLOMÃO, 2011), hidroxiapatita-titânia (GOMIDE, 2005)), etc.

Segundo Coelho e colaboradores (COELHO *et al.*, 2002) e Valerio e colaboradores (VALERIO *et al.*, 2004), as características que os biomateriais devem possuir são:

- a) Biocompatibilidade: o material deve ser atóxico, não promover reação de inflamação aguda ou crônica, ter uma baixa reatividade tecidual, ou seja, não promover rejeição do hospedeiro;
- b) Bioabsorção: o material deve possuir degradabilidade que irá acompanhar a formação de um novo tecido;
- c) Porosidade: o material deve possuir uma densidade de poros em torno de 75% com tamanhos médios de 200 a 400 μm de diâmetro, onde os poros devem ser interconectados, possuir grande área superficial, para favorecer a adesão protéica, além de aumentar a formação de colágeno;
- d) Quimiotaxia: o material deve atrair células mesenquimais e fornece meios de adesão celular, facilitando a proliferação e a diferenciação celulares;
- e) Angiogênese: o material deve promover vascularização, sendo hidrofílico, para absorver fluido sanguíneo e reforçar a coagulação inicial após a implantação;

- f) Baixo custo: o material não pode exceder o valor do autoenxerto, possuindo materiais constituintes em abundância e uma esterilização eficiente.

Para que sejam desenvolvidos *scaffolds*, algumas características devem ser levadas em conta, a saber:

- a) Devem suportar a deposição e crescimento celular;
- b) Devem possuir uma taxa de degradação controlada a fim de suportar as duas fases de desenvolvimento tecidual (*in vitro* e *in vivo*), sem perder as propriedades mecânicas necessárias para substituir o tecido perdido;
- c) Devem ter uma taxa de degradação de tal forma que haja espaço suficiente para o tecido se desenvolver, à medida que o material é reabsorvido (RATNER *et al.*, 1996).

Os biomateriais interagem com o ambiente do tecido em que são implantados, podendo ter interações onde há os seguintes efeitos: a) do implante sobre o hospedeiro; e b) do hospedeiro sobre o implante (ANDERSON *et al.*, 1996).

Os efeitos do implante no hospedeiro podem ser: a) local (interação entre sangue – material, toxicidade, infecção, etc.); e b) sistêmica e remota (hipersensibilidade, elevação dos elementos do implante no sangue, etc.), enquanto que os efeitos do hospedeiro no implante podem ser: a) efeitos físico-mecânicos (desgaste abrasivo, fadiga, corrosão, degeneração, etc.); e b) efeitos biológicos (calcificação, degradação enzimática, etc.) (ANDERSON *et al.*, 1996).

Essas etapas são as fases desejáveis para integração do implante ao organismo vivo. Contudo, a presença do biomaterial pode acarretar em processos indesejáveis para interação com o tecido, estimulando uma resposta inflamatória, levando a uma agressão no local de implantação. Nesse processo inflamatório, a resposta do hospedeiro ao biomaterial promove a liberação de mediadores químicos que desencadearão processos tais como a vasodilatação, com aumento da permeabilidade vascular e extravasamento de líquido intravascular. Este exsudado, com vários mediadores químicos, pode ativar células vizinhas

e outros vasos sanguíneos, determinando a liberação de outros fatores pré-inflamatórios e o recrutamento celular (ANDERSON *et al.*, 1996).

A inflamação aguda pode evoluir para um processo crônico, com a permanência do estímulo, promovendo o recrutamento e a diferenciação de fibroblastos, assim como sua ativação, o que dá início ao processo de reparo ou remodelagem do tecido (BAYLEY, 1988). Também é possível que esses fibroblastos formem um depósito de tecido conjuntivo denso e colagenoso em torno do material, encapsulando e isolando o implante do tecido circunvizinho. Com isso, não há possibilidade de integração do tecido ao biomaterial, o que é considerado como uma resposta negativa à sua presença no organismo e à sua função de proliferação celular (ANDERSON *et al.*, 1996).

Outra estratégia é a combinação de células, que são elementos fundamentais durante o reparo e regeneração com o biomaterial. Com a utilização de uma linhagem de células apropriadas, seria possível prever as respostas celulares com técnicas de proliferação e diferenciação dessas (HENCH; POLAK, 2002).

Atualmente, a engenharia tecidual vem permitindo a utilização de células do próprio paciente, de doadores e células-tronco fetais ou de adultos, cultivados em *scaffolds* de materiais compatíveis com o organismo. Essa metodologia aparece como uma boa alternativa para aplicações médicas pelo benefício ao paciente, uma vez que, a partir de um pequeno número de células, via expansão em culturas *in vitro*, podem minimizar a rejeição dos implantes (KELLOMAKI *et al.*, 2004; MAY *et al.*, 2007).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

- **Hidroxiapatita:**

A hidroxiapatita utilizada neste trabalho foi gentilmente cedida pela empresa Inside Materiais Avançados Ltda., localizada em Belo Horizonte, MG. Foram realizados ensaios de fluorescência de raios X e difração de raios X das amostras, com o intuito de identificar as fases presentes e a composição química. A fluorescência de raios X foi realizada em um espectrômetro de fluorescência de raios X Rigaku RIX 3100, pertencente ao Departamento de Engenharia de Materiais (DEMA) da Faculdade de Engenharia Mecânica (FEM) da Unicamp.

A Tabela 3.1 indica a composição química da hidroxiapatita, determinada por fluorescência de raios X (FRX).

A análise de difração de raios X (DRX), na Figura 3.1, identificou os picos principais da hidroxiapatita verde.

Tabela 3.1 – Resultados de fluorescência de raios X da hidroxiapatita, como recebida.

| Componente | Quantidade em massa (%) |
|------------|-------------------------|
| O | 45,428 |
| Ca | 37,168 |
| P | 17,018 |
| Mg | 0,131 |
| Sr | 0,083 |
| Si | 0,051 |
| Al | 0,045 |
| Fe | 0,022 |
| S | 0,019 |
| Na | 0,017 |
| K | 0,013 |
| Ni | 0,005 |

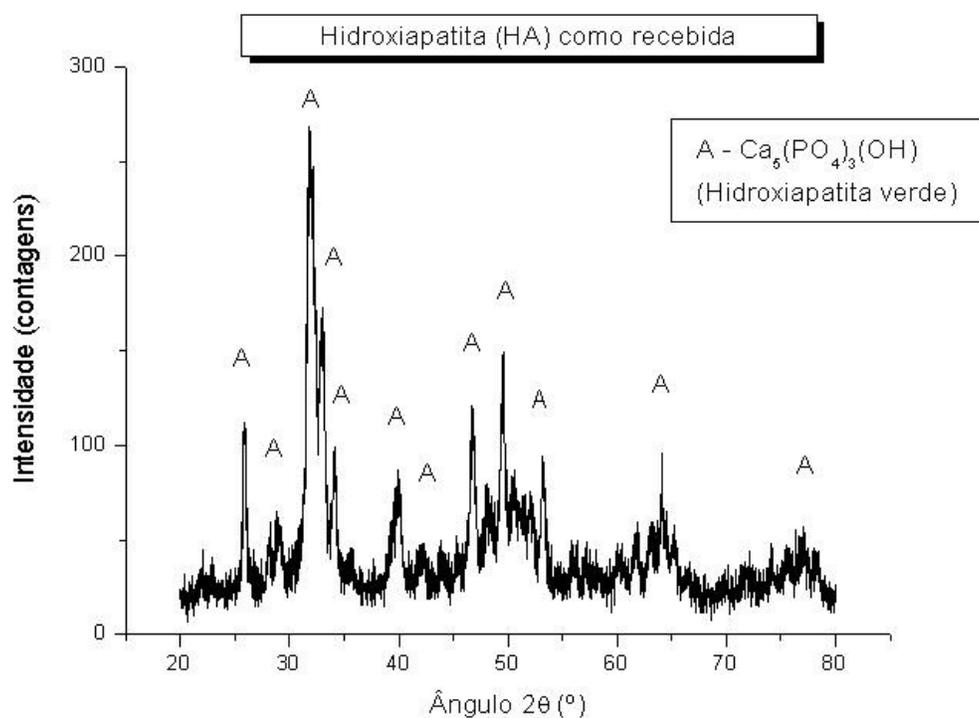


Figura 3.1 – Difratograma de raios X da hidroxiapatita como recebida.

- **Titânia (TiO₂):**

A titânia comercial utilizada neste trabalho foi fabricada pela Kronos Indústria de Abrasivos Ltda. Assim como aconteceu com a hidroxiapatita, foram realizados ensaios de fluorescência de raios X e difração de raios X nas amostras, com o intuito de identificar as fases presentes e a composição química.

Os resultados da análise por fluorescência de raios X (FRX) estão indicados na Tabela 3.2 a seguir.

Tabela 3.2 – Resultados de fluorescência de raios X para a titânia, como recebida.

| Componente | Quantidade em massa (%) |
|------------------------------------|--------------------------------|
| TiO₂ | 95,084 |
| Al₂O₃ | 3,586 |
| SiO₂ | 1,106 |
| Na₂O | 0,115 |
| SO₃ | 0,033 |
| CaO | 0,028 |
| P₂O₅ | 0,023 |
| Fe₂O₃ | 0,009 |
| NiO | 0,009 |
| As₂O₃ | 0,007 |

O resultado da análise de difração de raios X (DRX), na Figura 3.2, indicou a presença da fase rutilo.

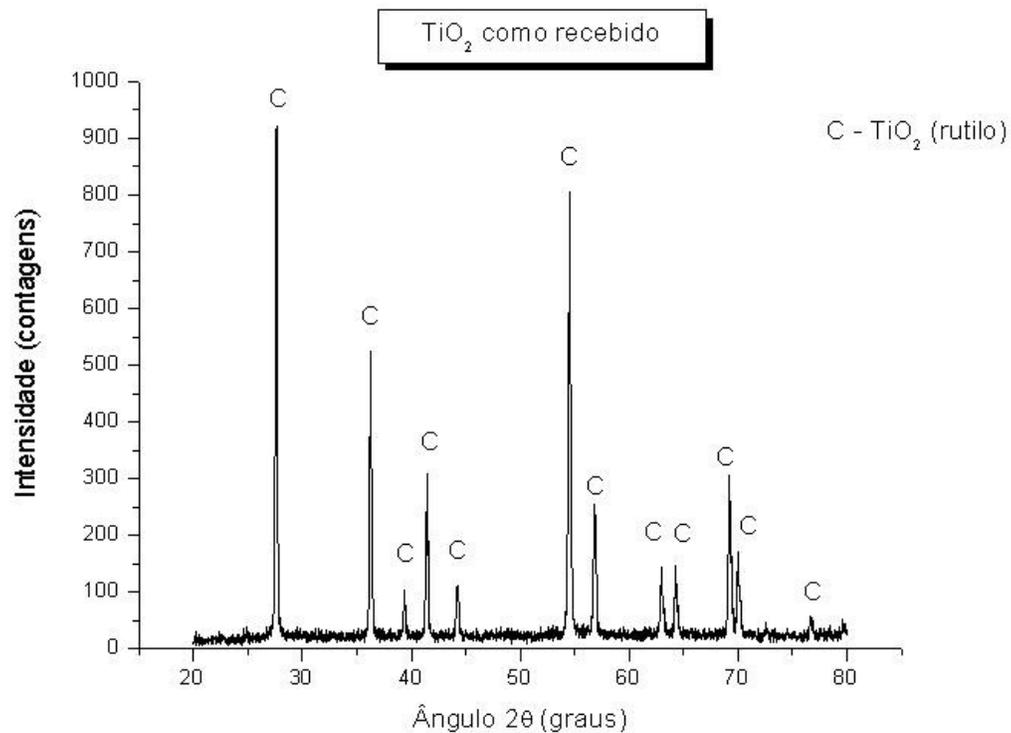


Figura 3.2 – Difratoograma de raios X para a titânia como recebida.

- Esponja polimérica:

A esponja polimérica utilizada foi uma esponja de poliuretano, adquirida no comércio de Campinas, e a sua estrutura de poros pode ser vista na Figura 3.3. Por ser um material amorfo, não foi realizado DRX e nem se realizou TGA porque o poliuretano, em temperaturas acima de 400°C, volatiliza.

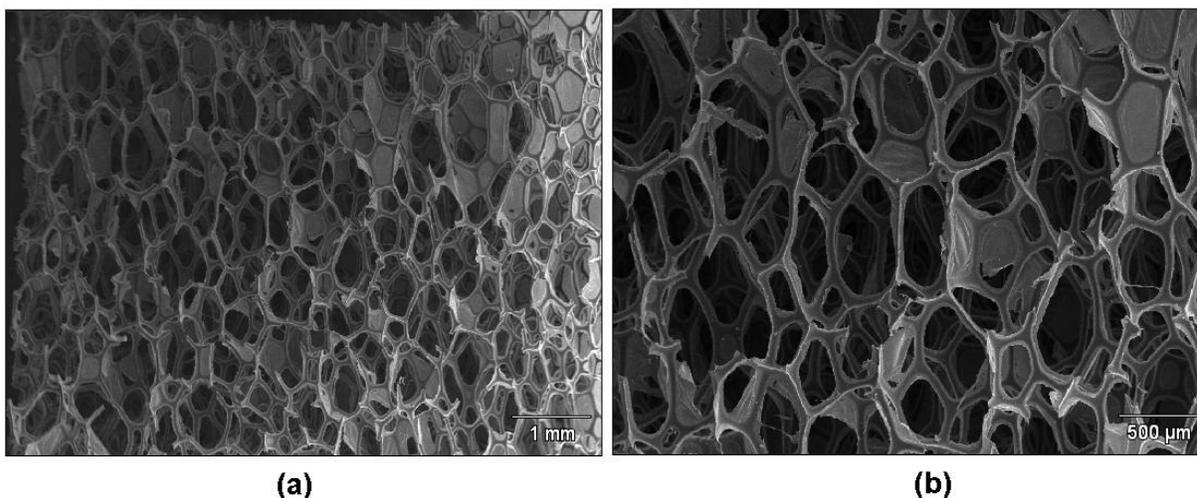


Figura 3.3 – Distribuição e forma dos poros para a esponja comercial de poliuretano. A parte (a) mostra uma visão geral da esponja, enquanto que a parte (b) mostra a geometria dos poros.

- Produtos químicos:

Foram utilizados bicarbonato de sódio NaHCO_3 da Merck, álcool comercial da Cooperalcool INPM 92,8° e água destilada, todos gentilmente cedidos pelo laboratório de biomecânica (Labiomec) da Faculdade de Engenharia Mecânica (FEM) da Unicamp.

3.2. Métodos:

Este trabalho foi dividido em quatro etapas (preparação das composições utilizadas nas amostras, caracterização estrutural, ensaios físicos e mecânicos, ensaios *in vitro*), onde os corpos de prova foram confeccionados em tamanhos diferentes, de acordo com a necessidade em cada etapa.

- Preparação das composições utilizadas nas amostras:

As composições de 50% HA – 50% TiO_2 , 60% HA – 40% TiO_2 e 70% HA – 30% TiO_2 , bem como as temperaturas de trabalho, foram escolhidas de acordo com trabalho realizado pelo grupo de trabalho do LABIOMECC, na dissertação da aluna Viviane Silva

Gomide (2005), que realizou ensaios de caracterização estrutural e mecânica com três compósitos densos diferentes (HA – Al₂O₃, HA – TiO₂ e HA – ZrO₂).

- **Método de preparação dos corpos de prova para os ensaios de caracterização estrutural, física e mecânica:**

Inicialmente, a hidroxiapatita e a titânia, juntamente com o bicarbonato de sódio, foram misturadas e peneiradas em peneira ABNT com 710 µm de abertura. O bicarbonato de sódio foi misturado ao compósito por ser um agente ligante e flocculante. Três diferentes composições do compósito foram preparadas, a saber: 50% HA – 50% TiO₂ (Amostra A), 60% HA – 40% TiO₂ (Amostra B) e 70% HA – 30% TiO₂ (Amostra C).

Os corpos de prova foram confeccionados através do método de esponja polimérica descrita por Saggio-Woyansky e Scott (SAGGIO-WOYANSKY; SCOTT, 1992) com dimensões de 10 mm de diâmetro por 10 mm de altura para caracterização por microscopia eletrônica de varredura e difração de raios – x e com 5 mm de diâmetro por 12,5 mm de altura para os ensaios de compressão.

Em todos os casos, foram confeccionados cinco corpos de prova para avaliação. Estes foram aquecidos a 550°C, em rampa de aquecimento de 0,5°C/min para a retirada dos elementos orgânicos e em seguida sinterizados a 1250°C, 1300°C e 1350°C, em rampa de aquecimento de 10°C/min, permanecendo em tais temperaturas durante duas horas contínuas.

Para a volatilização da esponja polimérica foi utilizado um forno EDG FA-IV e para a sinterização dos corpos de prova utilizou-se um forno Lindberg Blue M Thermo Scientific, ambos pertencentes ao Labiomec. O resfriamento até a temperatura ambiente aconteceu dentro do forno.

- **Método de preparação dos corpos de prova para os ensaios *in vitro*:**

Foram preparados cinco corpos de prova de forma similar aos dos ensaios de caracterização física e mecânica, anteriormente citado, porém com dimensões de 10 mm de diâmetro por 15 mm de altura. Seguiu-se a mesma linha de rotina de retirada da esponja

polimérica e sinterização dos corpos de prova, apenas para a porção que apresentou os melhores resultados físicos e mecânicos.

- Ensaios físicos e mecânicos para os corpos de prova cerâmicos:

Os corpos de prova foram submetidos a ensaios tecnológicos, de acordo com metodologia descrita por Souza Santos (SOUZA SANTOS, 1989). As características cerâmicas observadas foram: porosidade aparente (PA), absorção de água (AA), retração linear de queima (RQ) e densidade aparente (DA). Os resultados foram obtidos através da média aritmética de cinco corpos de prova e foram calculadas através das equações (3.1), (3.2), (3.3) e (3.4), respectivamente.

$$PA(\%) = \left(\frac{P_U - P_S}{P_U - P_i} \right) \cdot 100 \text{ Equação (3.1)}$$

$$AA(\%) = \left(\frac{P_U - P_S}{P_S} \right) \cdot 100 \text{ Equação (3.2)}$$

$$RQ(\%) = \left(\frac{L_1 - L_2}{L_1} \right) \cdot 100 \text{ Equação (3.3)}$$

$$DA(g/cm^3) = \frac{P_S}{P_U - P_i} \text{ Equação (3.4)}$$

Onde P_U é o peso úmido; P_S é o peso seco; P_i é o peso imerso; L_1 é a altura do corpo de prova antes de ser sinterizado e L_2 é a altura do mesmo após sinterização. PA significa porosidade aparente, AA absorção de água, RQ é a retração linear após sinterização e DA é a densidade aparente. Para realização das medidas de peso, foi utilizada uma balança analítica Gehaka BK400 acoplada com um kit de medição de densidade, do mesmo fabricante da balança.

Para a resistência à compressão, utilizou-se a norma ASTM C1424 – 99 (Standard test method for monotonic compressive strength of advanced ceramics at ambient

temperatures). Para o ensaio, foi utilizada uma máquina universal de ensaios Emic DL2000, do Laboratório de Metalurgia Física e Solidificação do DEMA/Unicamp. O resultado foi obtido através da média aritmética de cinco corpos de prova. Os valores de limite de resistência à compressão (LRC) serão obtidos através da equação 3.5.

$$LRC(MPa) = \frac{P_{m\acute{a}x}}{A} \text{ Equa\c{c}\~{a}o (3.5)}$$

onde $P_{m\acute{a}x}$ é carga máxima (em N) e A é a área de seção transversal inicial (em mm^2) do corpo de prova.

Para o ensaio de micro-dureza, utilizou-se a norma C1327 – 99 (“Standard Test Method for Vickers Indentation of Advanced Ceramics”). Para o ensaio de micro-dureza utilizou-se um microdurômetro Shimadzu HMV Micro Hardness Tester, do Labiomec da FEM/Unicamp. Foram realizadas 10 penetrações por amostra e o resultado obtido foi a média aritmética com desvio padrão das penetrações realizadas.

A caracterização estrutural foi realizada através de difração de raios – x (DRX) e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Para análise de microscopia eletrônica utilizou-se um microscópio eletrônico de varredura modelo JXA – 840A da Jeol do Dema/FEM/Unicamp, onde também foi analisada a composição das fases através de Espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS).

Para análise de difração de raios – x utilizou-se um difratômetro convencional de dois eixos θ e 2θ para amostra policristalinas da marca Rigaku modelo DMAX 2200, pertencente ao laboratório de Tecnologia do Silício da Faculdade de Engenharia Mecânica da Unicamp, operado numa potência de 40kV / 20mA com radiação incidente de Cu ($\lambda_{k\alpha}$) e feixe difratado monocromatizado por um monocromador curvo de grafite. As amostras foram medidas num intervalo de 2θ : 20-80° no modo de varredura contínua com velocidade de 1°/min com passos de 0,02° a temperatura ambiente (23°C).

Para análise de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) foi utilizado um espectrômetro de infravermelho da marca Thermo Scientific Nicolet

IR100 FT-IR, gentilmente cedido pela Prof^a. Dra. Carmen Gilda Barroso Tavares Dias, da Universidade Federal do Pará.

- **Ensaaios *in vitro* para os corpos de prova cerâmicos:**

Os ensaios *in vitro* foram realizados no Laboratório de Bioquímica Clínica, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) da Universidade de São Paulo (USP). Os materiais utilizados para os ensaios citotóxicológicos e para crescimento de células nos corpos de prova foram:

- a) Soro fetal bovino (SFB), penicilina, estreptomicina e meio Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), que foram adquiridos da Invitrogen - Carlsbad, California, EUA);
- b) Brometo de (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolio (MTT) e dimetilsulfóxido (DMSO) que foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA);
- c) O formaldeído foi adquirido da Merck (Darmstadt, Germany).

Para os ensaios de adesão e proliferação nos suportes foram utilizadas fibroblastos e osteoblastos murinos imortalizados da linhagem NHI-3T3 e OFCOL II, respectivamente. As células foram gentilmente cedidas pela Prof^a Dra. Silvy Stucchi e Prof^a Dra. Primavera Garcia Borelli da FCF/USP. As células foram cultivadas com meio de cultura DMEM suplementado com 10% de SFB, 10.000 U/mL penicilina e 10.000 µg/mL estreptomicina. As células foram mantidas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C. O meio foi trocado a cada dois dias.

As células foram colocadas na superfície dos suportes na densidade de $2,5 \times 10^4$ células e mantidas em estufa de CO₂ por cinco dias. Após este período os suportes foram lavados com solução tampão fosfato (PBS) pH 7,4 e as células fixadas com formalina 10% por 15 minutos. Para a MEV, o material foi desidratado em soluções crescentes de etanol (25, 50, 70, 90, 95, 100, 100%), 10 min em cada concentração. Os suportes foram analisados por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

A viabilidade e proliferação celular foram determinadas pelo ensaio do MTT (capacidade das células viáveis reduzirem o brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio com a formação de cristais de formazan de cor púrpura), executado em diferentes períodos de interação das células com os suportes. As células foram colocadas na superfície dos suportes na densidade de $2,5 \times 10^4$ células e mantidas em estufa de CO_2 por 5 dias. A cada 24 horas, as membranas foram lavadas com PBS pH 7,4 e adicionado MTT (solução de 5 mg/mL) juntamente com meio DMEM (sem soro) na proporção de 1:5. As células foram incubadas por 3 h a 37°C . Após este período, o meio foi aspirado e adicionado 0,3 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). Após a dissolução dos cristais, a absorbância foi lida no espectrofotômetro a 490 nm (Biotek Microplate Reader).

As etapas realizadas neste trabalho estão indicadas nas Figuras 3.4, 3.5, 3.6, 3.7 e 3.8.

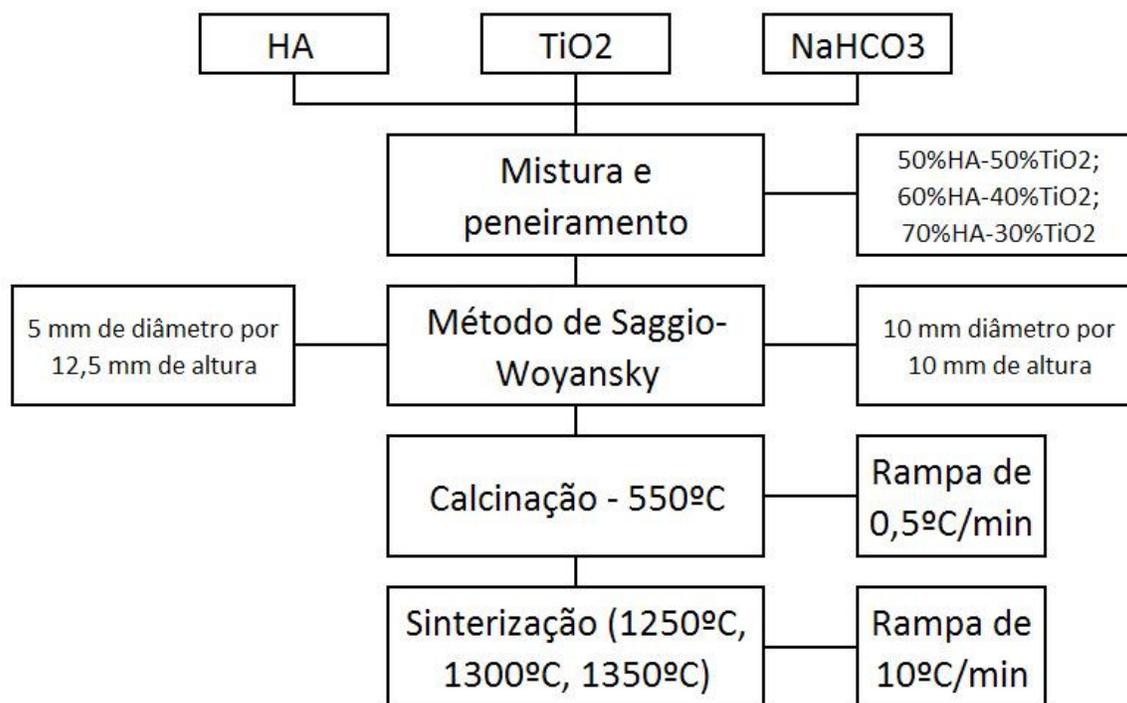


Figura 3.4 – Fluxograma detalhado da etapa de confecção dos corpos de prova.

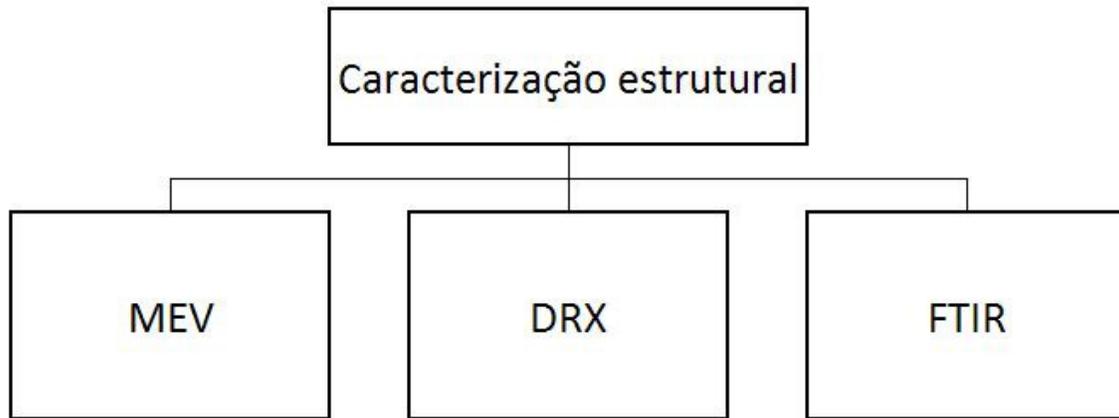


Figura 3.5 – Fluxograma detalhado da etapa de caracterização estrutural dos corpos de prova.

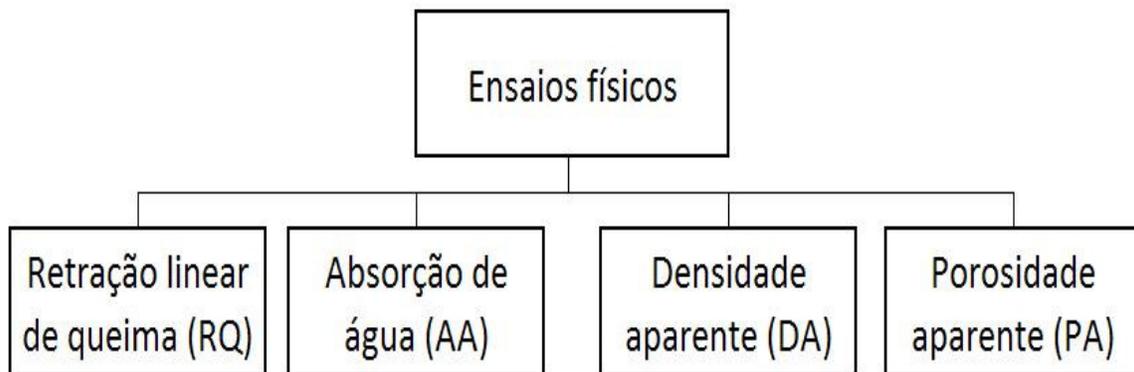


Figura 3.6 – Fluxograma detalhado da etapa de ensaios físicos.



Figura 3.7 – Fluxograma detalhado da etapa de ensaios mecânicos.

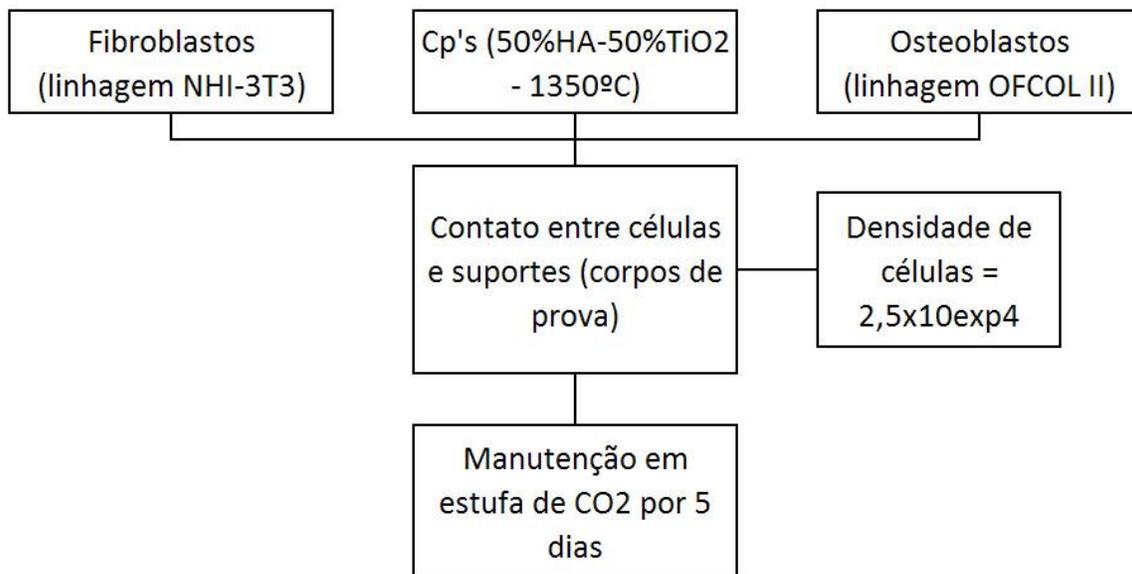


Figura 3.8 – Fluxograma detalhado da etapa de ensaios *in vitro*.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A seguir, serão mostrados os resultados obtidos para os ensaios realizados neste trabalho.

4.1. Ensaios de caracterização estrutural, físicos e mecânicos:

Os ensaios realizados foram obtidos da média aritmética de cinco corpos de prova porosos.

- Resultados dos ensaios de caracterização estrutural:

Foram realizadas as seguintes caracterizações nessa etapa: micrografia eletrônica de varredura (MEV), difração de raios X (DRX) e Espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS).

1. Amostra A (50% HA – 50% TiO₂):

A morfologia e distribuição dos poros do compósito A após sinterização a 1250°C podem ser vistas na Figura 4.1.

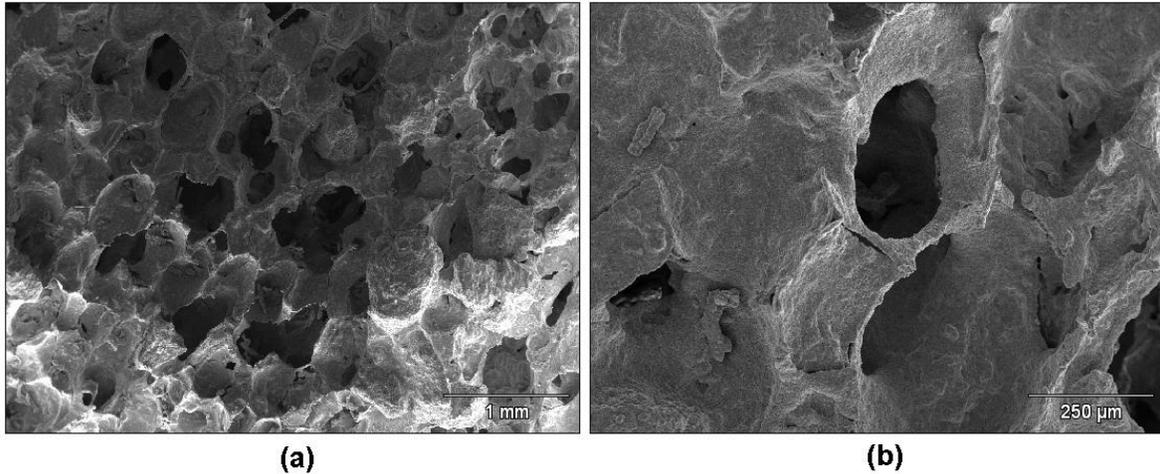


Figura 4.1 – Micrografias da amostra A sinterizada a 1250°C. (a) visão geral; (b) visão dos poros.

Pode ser observado que o corpo de prova reproduziu bem a estrutura física da esponja polimérica que volatilizou a 550°C (Figura 4.1(a)). Ainda é possível ver que o compósito não se apresenta bem sinterizado, uma vez que pode ser vista a presença de partículas individualizadas de HA-TiO₂ nas Figuras 4.1.(b) e 4.2.

Para se avaliar a composição química presente no compósito a 1250°C, realizou-se um ensaio de Espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS) na amostra, onde os pontos analisados podem ser vistos na Figura 4.2 e os resultados podem ser observados na Tabela 4.4. Os pontos foram escolhidos de forma aleatória, em posições distintas no corpo de prova.

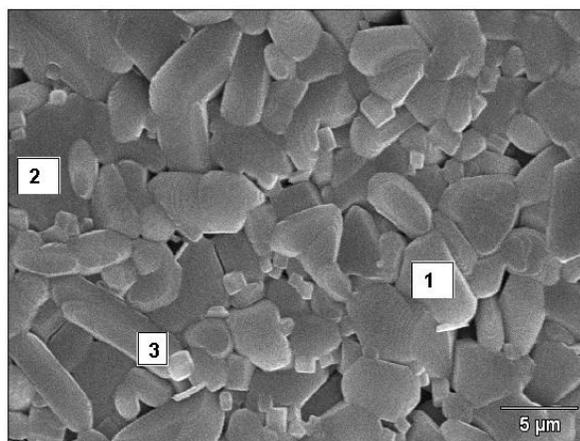


Figura 4.2 - Espectroscopia de raios X por dispersão de energia para a amostra A sinterizada a 1250°C.

Tabela 4.4 – Distribuições percentuais em massa dos elementos químicos presentes na amostra A sinterizada a 1250°C.

| Ponto | O-K | Si-K | P-K | Ca-K | Ti-K |
|--------------|------------|-------------|------------|-------------|-------------|
| 1 | 24,29 | -- | 24,89 | 34,69 | 16,12 |
| 2 | -- | 0,99 | 24,47 | 57,96 | 16,58 |
| 3 | 11,64 | -- | 3,77 | 12,91 | 71,69 |

Com esse resultado, observa-se que não há presença de resíduos da esponja polimérica de poliuretano e que apenas os elementos químicos principais da hidroxiapatita e da titânia estão presentes nos corpos de prova. Se porventura existissem resíduos da esponja polimérica, esses seriam um aspecto negativo, uma vez que, por ser derivado do petróleo, poderia acarretar em problemas posteriores de não adesão das células ou mesmo de morte das células.

Como foi utilizado bicarbonato de cálcio como agente ligante e flocculante, mesmo em pequena quantidade, se fez necessário realizar um ensaio de difração de raios X, para comprovar se o bicarbonato de cálcio ainda se encontrava presente no compósito em questão. O resultado de difração de raios X para a amostra sinterizada a 1250°C está indicado na Figura 4.3.

Assim, foi possível comprovar que houve transformação de fases, onde a hidroxiapatita passou para fosfato de cálcio, além da combinação do cálcio com o titânio e

oxigênio, formando titanato de cálcio. A fase TiO_2 permaneceu presente no compósito. Quanto à esponja, não houve resíduo presente.

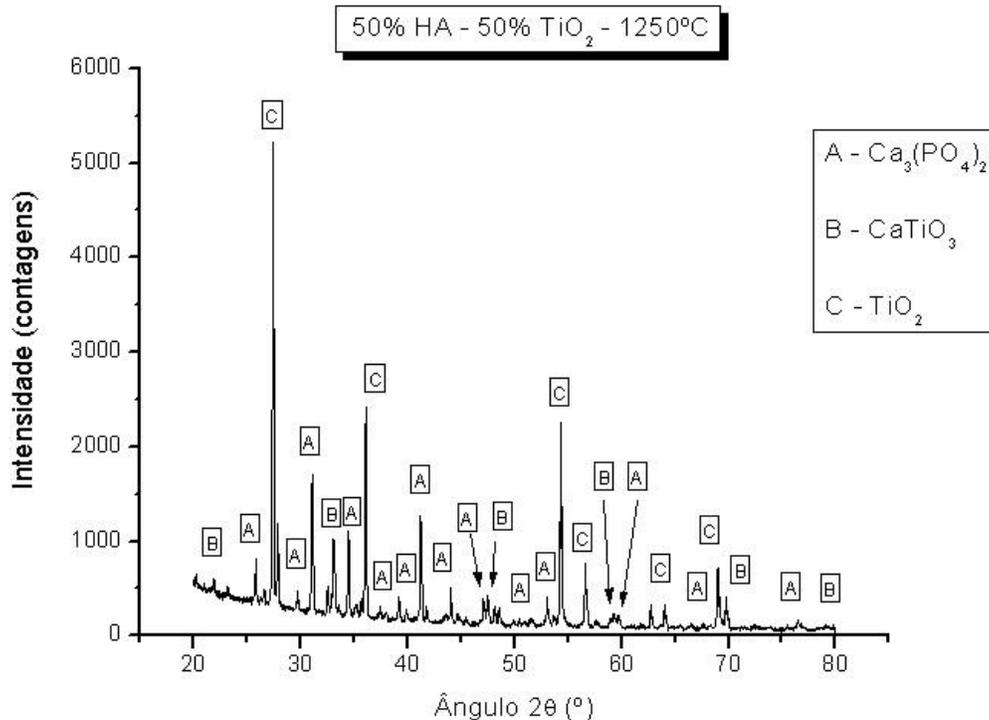


Figura 4.3 – Difratoograma de raios X para a amostra A sinterizada a 1250°C.

Foram realizados ensaios de caracterização para os compósitos sinterizados a 1300°C semelhantemente aos que foram realizados para os sinterizados a 1250°C.

Os resultados de microscopia eletrônica de varredura estão indicados na Figura 4.4. Assim como ocorreu com o compósito a 1250°C, houve também uma manutenção da estrutura física da esponja polimérica retirada a 550°C (Figura 4.4(a)), porém se percebe que houve maior contato e crescimento entre as partículas a 1300°C do que a 1250°C (Figuras 4.4(b) e 4.5), uma vez que os átomos das partículas pequenas são transferidos para as maiores de HA- TiO_2 na amostra.

Quanto ao tamanho dos poros, é possível perceber que houve uma redução no tamanho, o que é facilmente explicado por conta da densificação do corpo de prova, uma vez que a energia térmica fornecida foi maior, permitindo maior difusão de átomos das partículas pequenas para as partículas maiores, reduzindo, assim, a porosidade.

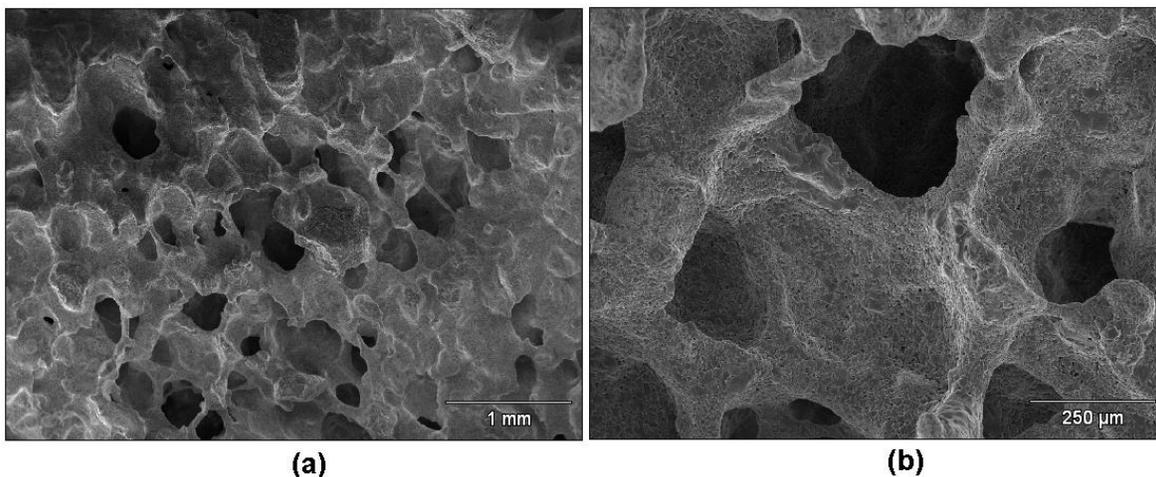


Figura 4.4 – Micrografias da amostra A sinterizada a 1300°C. (a) visão geral; (b) visão dos poros.

Os pontos onde foi realizada a análise de Espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS) na amostra estão indicados na Figura 4.5, e os resultados desse ensaio podem ser observados na Tabela 4.5. Os pontos foram escolhidos aleatoriamente.

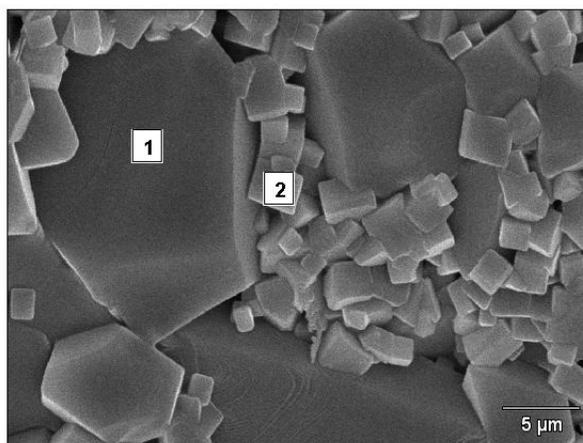


Figura 4.5 - Espectroscopia de raios X por dispersão de energia para a amostra A sinterizada a 1300°C.

Tabela 4.5 – Distribuições percentuais em massa dos elementos químicos presentes na amostra A sinterizada a 1300°C.

| Ponto | O-K | Na-K | Al-K | P-K | Ca-K | Ti-K |
|--------------|------------|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|
| 1 | 23,33 | 1,98 | 0,17 | 25,10 | 46,91 | 2,51 |
| 2 | 11,23 | -- | -- | 2,55 | 37,34 | 48,88 |

Com os resultados mostrados na Tabela 4.5, observa-se a presença de sódio e alumínio, embora em pequenas quantidades, o que não foi evidenciada quando o compósito foi sinterizado a 1250°C. A presença do alumínio é devido ao aumento da quantidade percentual do dióxido de titânio, que apresenta um percentual em torno de 3% de óxido de alumínio, conforme indicado na Tabela 3.2. Há também presença de óxido de sódio, porém a quantidade é muito baixa (Tabela 3.2).

O resultado de difração de raios X para a amostra sinterizada a 1300°C está indicado na Figura 4.6. Assim como ocorreu com o compósito sinterizado a 1250°C, apenas os componentes principais estão presentes no corpo de prova. Observa-se também uma alteração na intensidade dos picos principais do fosfato de cálcio, do titanato de cálcio e da titânia.

Foram realizados ensaios de caracterização estrutural para os compósitos sinterizados a 1350°C semelhantemente aos que foram realizados anteriormente a 1250°C e 1300°C.

Os resultados de microscopia eletrônica de varredura estão indicados na Figura 4.7. Observa-se aqui também uma manutenção da estrutura física da esponja polimérica retirada a 550°C (Figura 4.7(a)), porém se percebe que houve maior difusão de átomos de partículas pequenas para partículas maiores a 1350°C que a 1250°C e 1300°C (Figuras 4.7(b) e 4.8), uma vez que não aparecem partículas pequenas de HA-TiO₂ na amostra. Quanto ao tamanho dos poros, é possível perceber que houve uma redução mais acentuada no tamanho destes que a 1300°C, resultado de uma maior densificação do corpo de prova, uma vez que

a energia térmica fornecida foi bem maior, garantindo maior transferência de átomos de partículas pequenas para partículas maiores, reduzindo, assim, a porosidade.

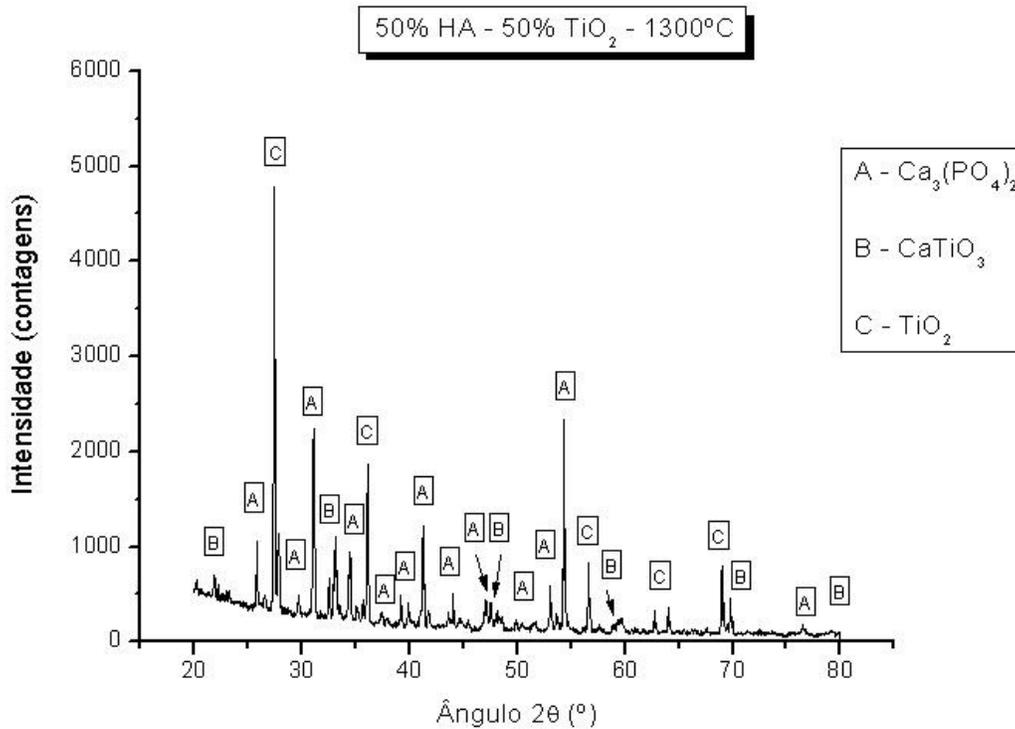


Figura 4.6 – Difratoograma de raios X para a amostra A sinterizada a 1300°C.

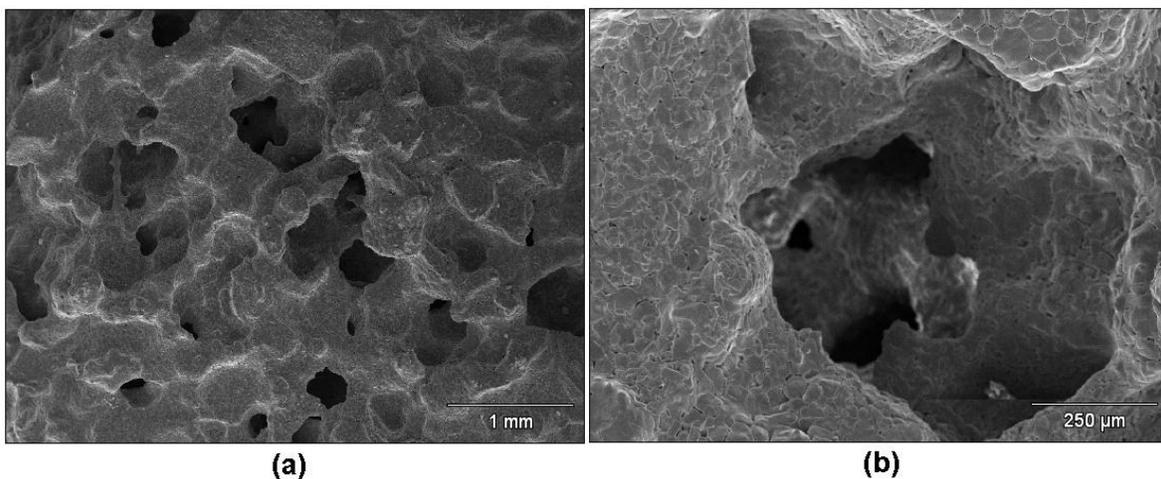


Figura 4.7 – Micrografias da amostra A sinterizada a 1350°C. (a) visão geral; (b) visão dos poros.

As análises por Espectroscopia de raios X por dispersão de energia foram realizadas em três pontos que estão indicados na Figura 4.8, e os resultados desse ensaio podem ser observados na Tabela 4.6.

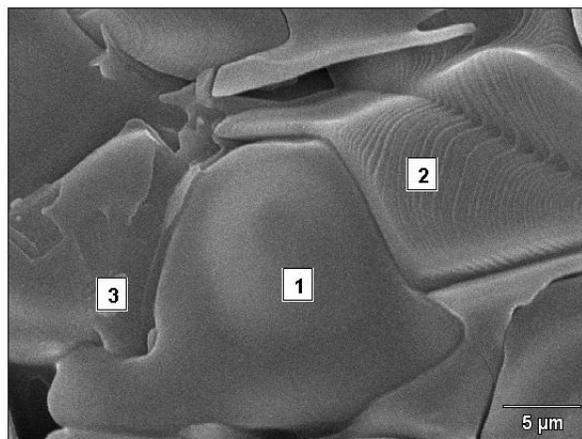


Figura 4.8 - Espectroscopia de raios X por dispersão de energia para a amostra A sinterizada a 1350°C.

Tabela 4.6 – Distribuições percentuais em massa dos elementos químicos presentes na amostra A sinterizada a 1350°C.

| Ponto | O-K | Al-K | P-K | Ca-K | Ti-K |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1 | 14,24 | -- | 29,32 | 53,47 | 2,98 |
| 2 | -- | -- | 0,00 | 2,76 | 97,24 |
| 3 | -- | 15,55 | 0,00 | 4,18 | 80,27 |

Com os resultados mostrados na Tabela 4.6, observa-se a presença de alumínio no ponto 3, em quantidade considerável, o que não foi evidenciada quando o compósito foi sinterizado a 1250°C e 1300°C. Essa quantidade de alumínio parece evidenciar a formação de aluminetos de titânio, o que se esperou comprovar com o ensaio de difração de raios X.

O resultado de difração de raios X para a amostra sinterizada a 1350°C está indicado na Figura 4.6. Assim como ocorreu com o compósito sinterizado a 1250°C e a 1300°C, apenas as fases principais estão presentes e que não há presença de aluminetos de titânio no corpo de prova. Foram observadas também alterações na intensidade dos picos principais do fosfato de cálcio, do titanato de cálcio e da titânia.

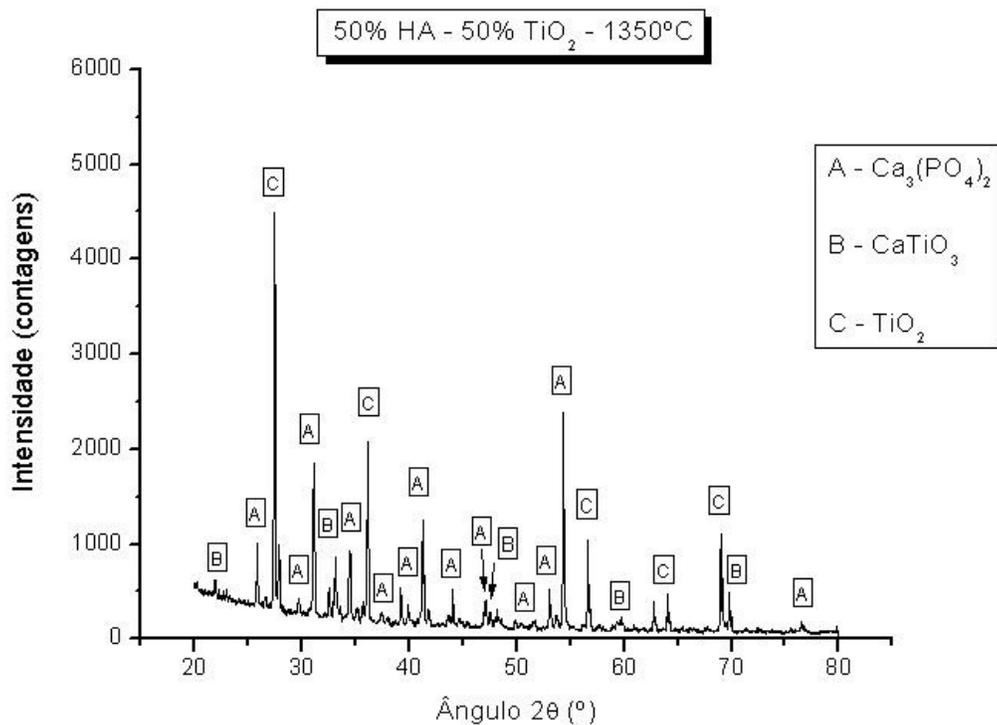


Figura 4.9 – Difratoograma de raios X para a amostra A sinterizada a 1350°C.

2. Amostra B (60% HA – 40% TiO₂):

A morfologia e distribuição de poros do compósito B após sinterização a 1250°C pode ser observada na Figura 4.10.

É possível observar que a estrutura do compósito reproduziu totalmente a da esponja polimérica após calcinação (Figura 4.10(a)), enquanto que o tamanho dos poros e seu formato podem ser vistos na Figura 4.10(b), onde há presença de poros grandes e pequenos, com interconectividade entre eles.

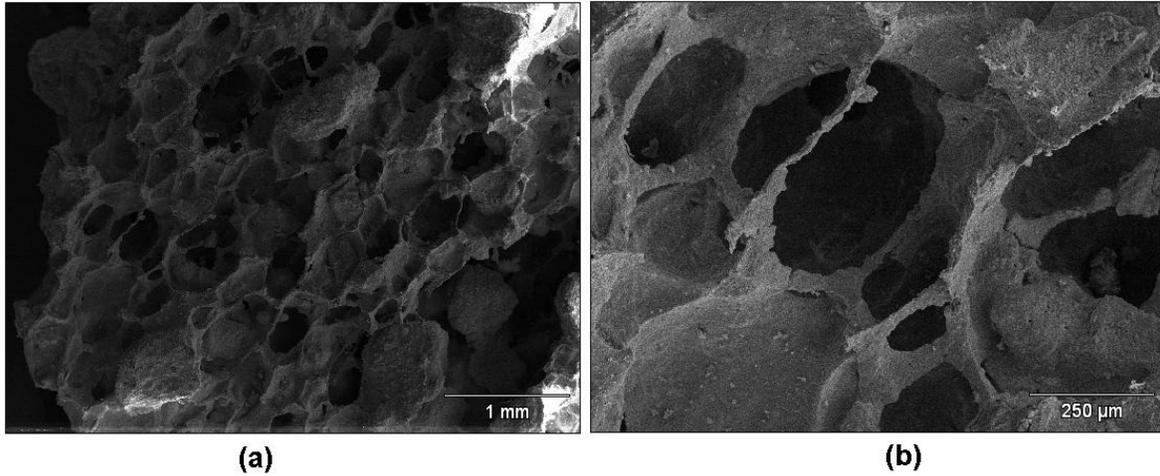


Figura 4.10 – Micrografias da amostra B sinterizada a 1250°C. (a) visão geral; (b) visão dos poros.

Os pontos onde foram realizadas as análises por Espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS) na amostra estão indicados na Figura 4.11, e os resultados desse ensaio podem ser observados na Tabela 4.7.

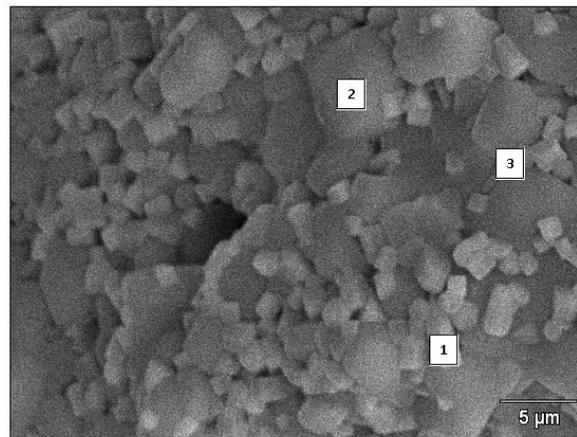


Figura 4.11 - Espectroscopia de raios X por dispersão de energia para a amostra B sinterizada a 1250°C.

Tabela 4.7 – Distribuições percentuais (em massa) dos elementos químicos presentes na amostra B sinterizada a 1250°C.

| Ponto | O-K | Al-K | P-K | Ca-K | Ti-K |
|-------|-------|------|-------|-------|-------|
| 1 | 16,41 | -- | 11,50 | 39,71 | 32,39 |
| 2 | 12,94 | 0,53 | 16,02 | 48,93 | 21,58 |
| 3 | 7,19 | -- | 11,18 | 49,26 | 32,37 |

De acordo com os resultados indicados na Tabela 4.7, observa-se que haja um pequeno percentual de alumínio presente. Contudo, esse percentual não é suficiente para formação de aluminetos.

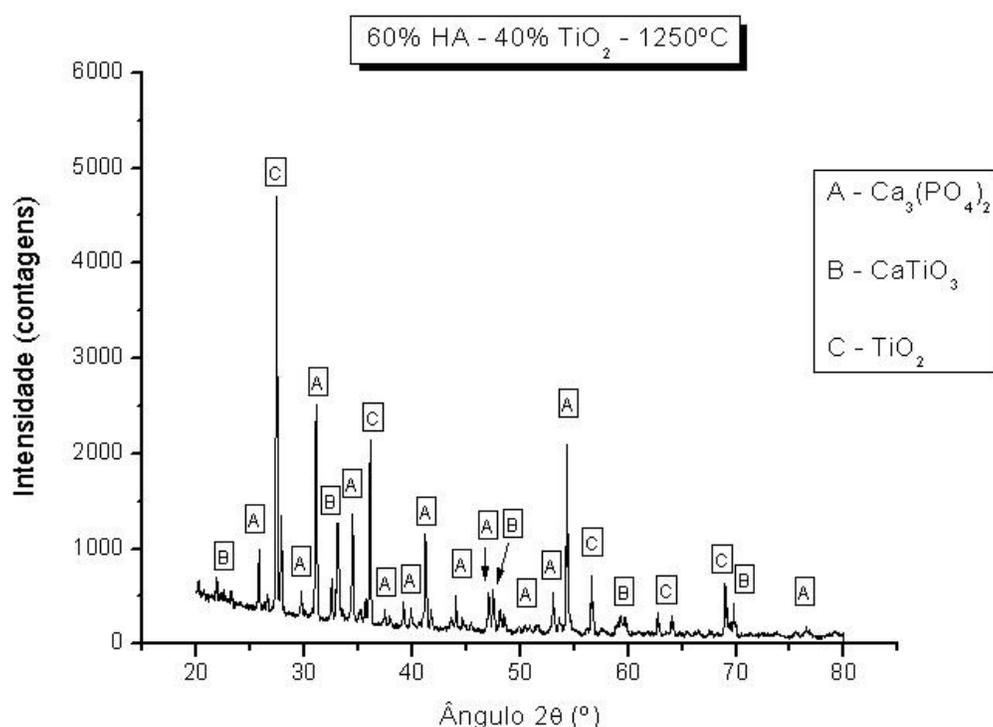


Figura 4.12 – Difratoograma de raios X para a amostra B sinterizada a 1250°C.

Pelo difratograma de raios X indicado na Figura 4.12, é possível observar que após sinterização a 1250°C não ficou resíduo da esponja polimérica, uma vez que apenas o fosfato de cálcio, o titanato de cálcio e a titânia estão presentes.

Assim como aconteceu com a amostra B sinterizada a 1250°C, a 1300°C também houve uma boa reprodutibilidade do compósito após a calcinação da esponja polimérica

(Figura 4.13(a)). O formato dos poros é bem semelhante ao já mostrado na Figura 4.10(b), porém com tamanhos levemente inferiores a estes, uma vez que a sinterização se deu em temperatura com 50°C acima, o que fornece energia suficiente para uma maior densificação da amostra (Figura 4.13(b)).

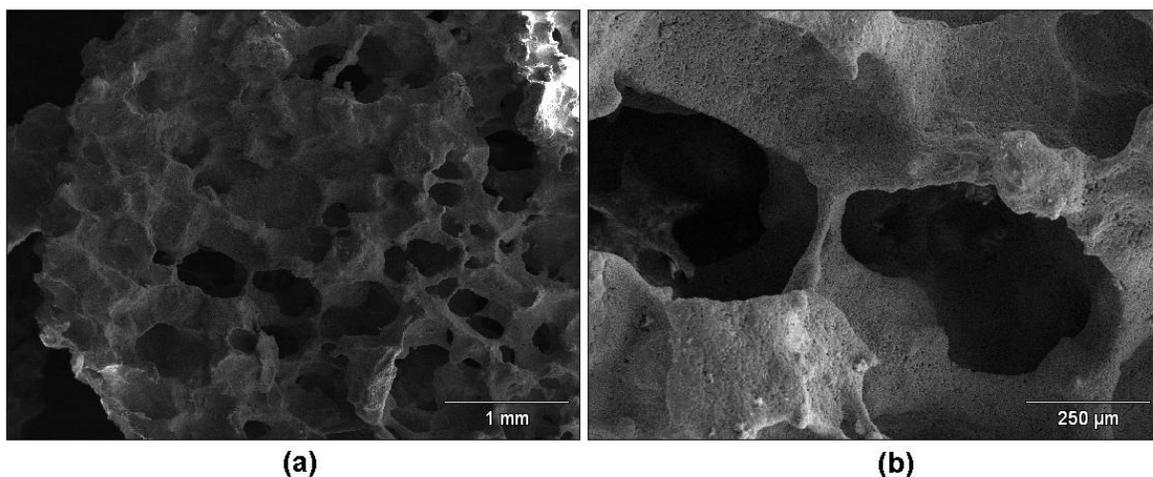


Figura 4.13 – Micrografias da amostra B sinterizada a 1300°C. (a) visão geral; (b) visão dos poros.

Os pontos onde foram realizadas as análises de Espectroscopia de raios X por dispersão de energia na amostra B após sinterização a 1300°C estão indicados na Figura 4.14.

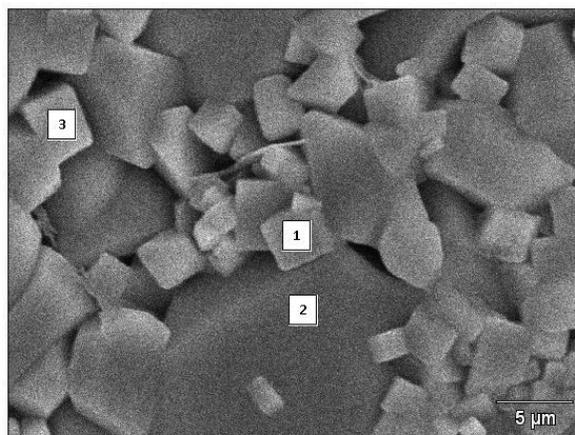


Figura 4.14 - Espectroscopia de raios X por dispersão de energia para a amostra B sinterizada a 1300°C.

Além dos pontos do ensaio, é possível observar que para esta condição de temperatura, houve uma maior difusão de átomos de partículas pequenas para partículas maiores que a observada na Figura 4.11.

Tabela 4.8 – Distribuições percentuais em massa dos elementos químicos presentes na amostra B sinterizada a 1300°C.

| Ponto | O-K | Al-K | P-K | Ca-K | Ti-K |
|-------|-------|------|-------|-------|-------|
| 1 | 19,53 | - | 2,83 | 32,16 | 45,49 |
| 2 | 25,34 | 0,76 | 26,67 | 44,10 | 3,13 |
| 3 | 31,73 | - | 1,56 | 3,58 | 63,13 |

Assim como aconteceu com a amostra B a 1250°C, a 1300°C também se observaram apenas os elementos químicos que constituem a hidroxiapatita e a titânia, com um percentual mínimo de alumínio no ponto 2 (Tabela 4.8).

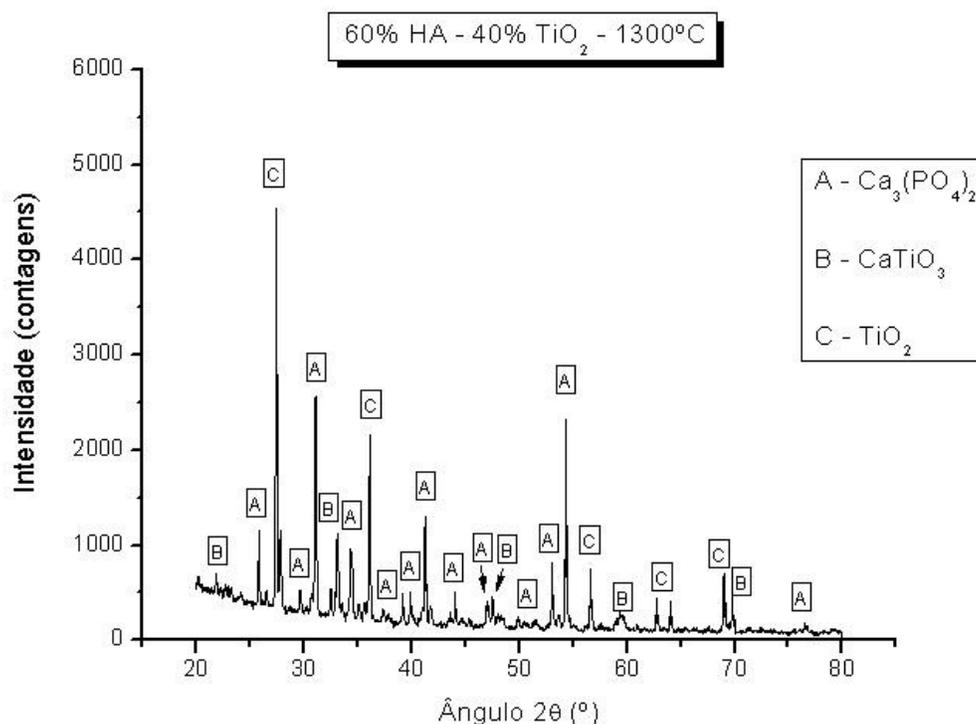


Figura 4.15 – Difratoograma de raios X para a amostra B sinterizada a 1300°C.

O difratograma de raios X indicado na Figura 4.15 mostra que mesmo com um pequeno percentual de alumínio presente na Tabela 4.8, não há presença de outras fases que não sejam apenas as do fosfato de cálcio, do titanato de cálcio e da titânia, porém é possível se observar que houve mudança nas intensidades dos picos principais das fases.

Após sinterização a 1350°C, a amostra B manteve a forma dos poros semelhante ao visto na esponja polimérica (Figuras 4.16a e b), porém como houve maior energia térmica fornecida ao compósito, houve tempo e energia suficientes para que os grãos dessa composição crescessem mais e pudessem se agregar mais (grãos maiores coalescendo com grãos menores).

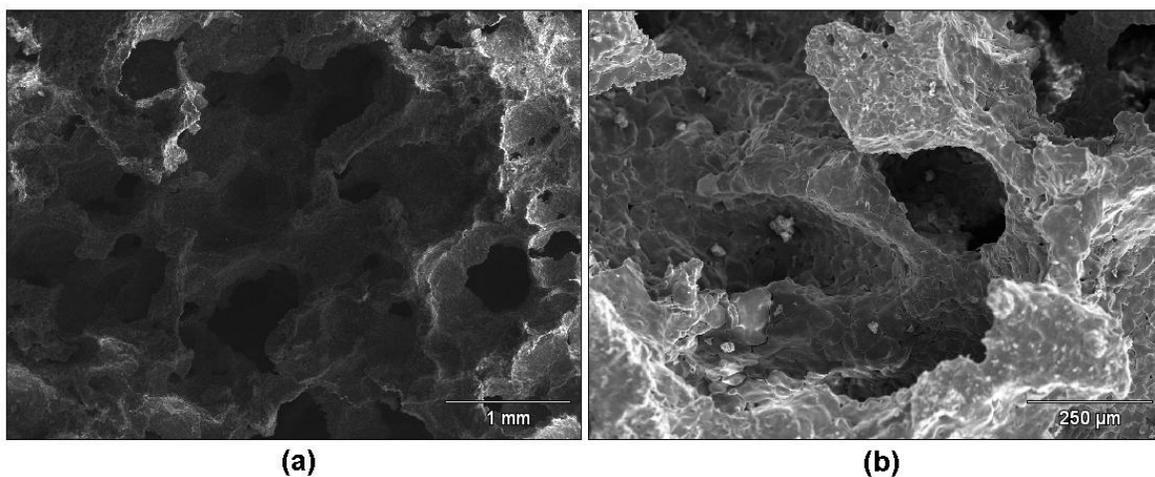


Figura 4.16 – Micrografias da amostra B sinterizada a 1350°C. (a) visão geral; (b) visão dos poros.

Assim como aconteceu com a amostra B a 1250°C e a 1300°C, realizou-se EDS para verificar a presença de resíduos da esponja polimérica, cujo resultado está indicado na Figura 4.17 e na Tabela 4.9.

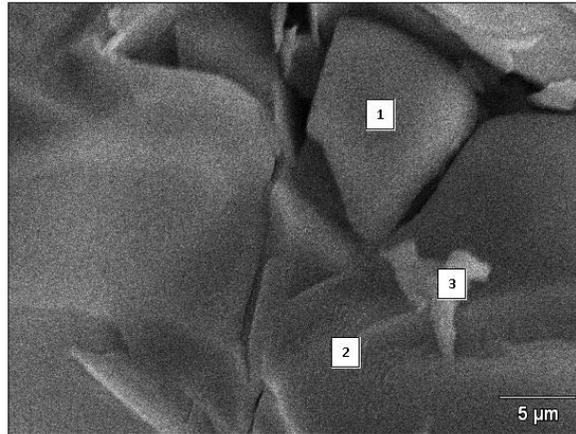


Figura 4.17 - Espectroscopia de raios X por dispersão de energia para a amostra B sinterizada a 1350°C.

Novamente, houve a presença apenas dos elementos químicos da hidroxiapatita e titânia, com a presença de alumínio em certa quantidade apenas no ponto 3 da Figura 4.17.

Tabela 4.9 – Distribuições percentuais em massa dos elementos químicos presentes na amostra B sinterizada a 1350°C.

| Ponto | O-K | Al-K | P-K | Ca-K | Ti-K |
|--------------|------------|-------------|------------|-------------|-------------|
| 1 | 43,51 | 0,84 | -- | 17,53 | 33,50 |
| 2 | 48,33 | 0,25 | -- | 1,57 | 2,16 |
| 3 | 49,39 | 12,42 | 0,78 | 13,16 | 19,52 |

Após a realização do ensaio de difração de raios X (Figura 4.18), foi observada a presença apenas da hidroxiapatita e da titânia, mesmo com um valor percentual razoável de alumínio no ponto 3, o que poderia sugerir a formação de alguma fase que não as três esperadas. Assim como aconteceu a 1300°C para essa amostra, também houve alteração na intensidade dos picos do $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, do CaTiO_3 e do TiO_2 .

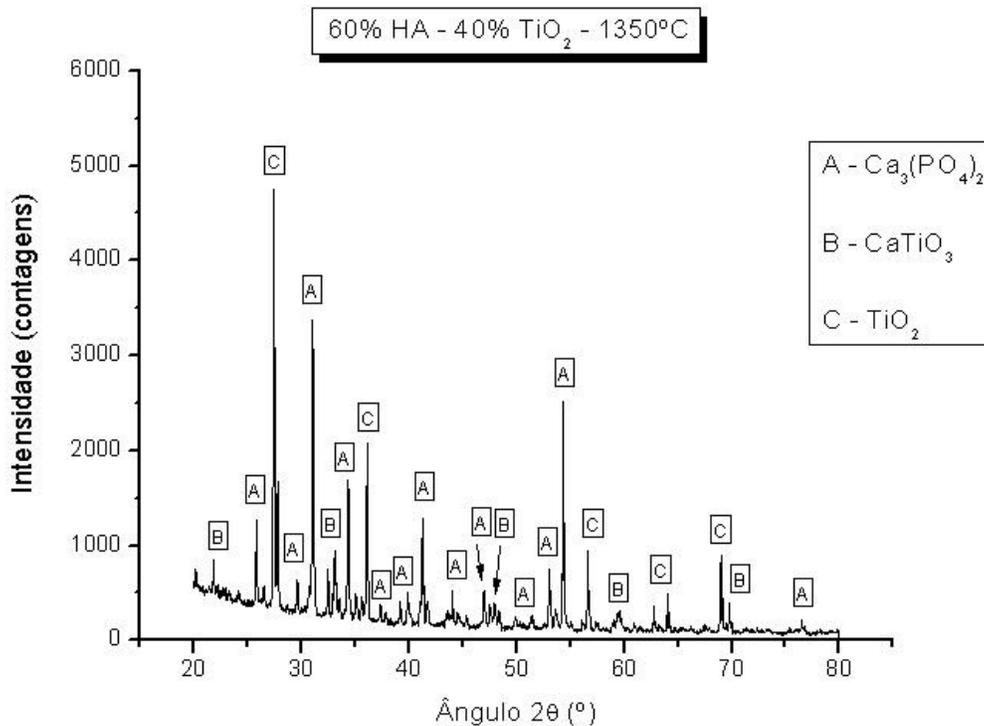


Figura 4.18 – Difratoograma de raios X para a amostra B sinterizada a 1350°C.

3. Amostra C (70% HA – 30% TiO₂):

Assim como aconteceu com as amostras A e B, a amostra C também foi sinterizada a 1250°C, 1300°C e 1350°C. O aspecto geral da amostra e a forma dos poros após sinterização a 1250°C estão indicados na Figura 4.19. É observado que os poros mantiveram o formato semelhante aos da esponja polimérica, além de ter uma distribuição relativamente uniforme ao longo da esponja cerâmica.

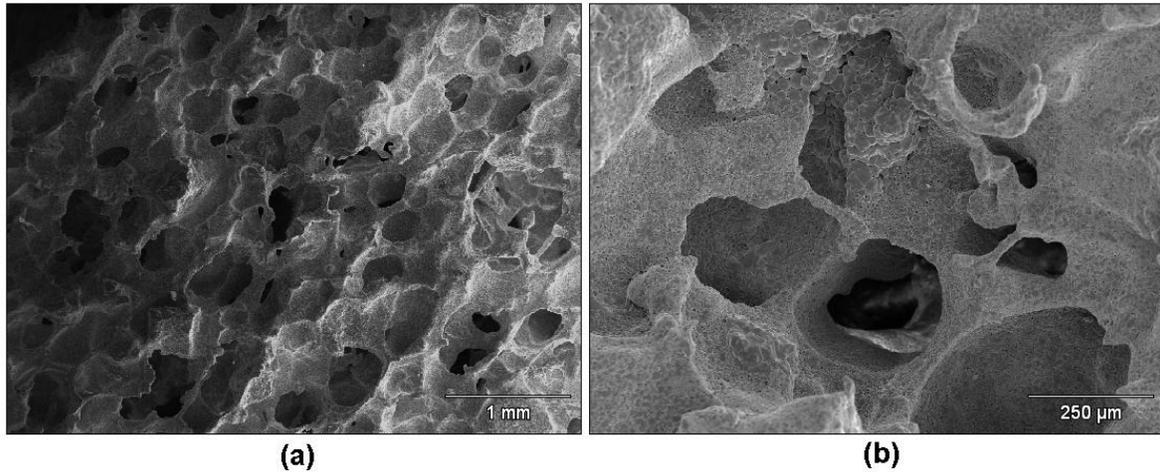


Figura 4.19 – Micrografias da amostra C sinterizada a 1250°C. (a) visão geral; (b) visão dos poros.

Para verificar se houve algum resíduo da esponja polimérica, realizou-se EDS em três pontos (Figura 4.20). Na mesma Figura é possível observar que há presença de grãos grandes e pequenos, que é indicativo de uma sinterização não tão favorável para quando se deseja amostras com maiores valores de resistência mecânica.

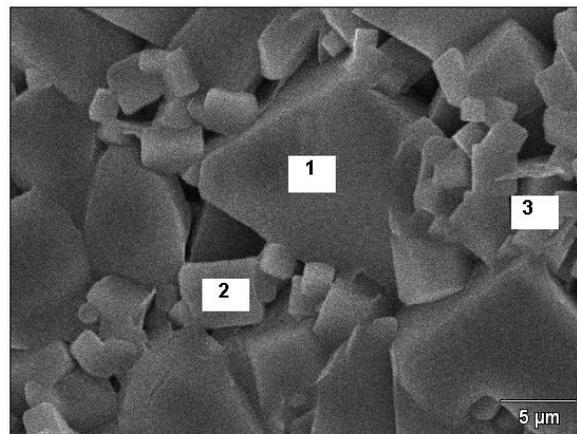


Figura 4.20 - Espectroscopia de raios X por dispersão de energia para a amostra C sinterizada a 1250°C.

Os resultados do ensaio de EDS encontram-se na Tabela 4.10. Assim como aconteceu anteriormente com as outras amostras a 1250°C, para a amostra C também só

houve a presença dos elementos químicos que compõem o fosfato de cálcio, o titanato de cálcio e a titânia.

Tabela 4.10 – Distribuições percentuais em massa dos elementos químicos presentes na amostra C sinterizada a 1250°C.

| Ponto | O-K | Na-K | P-K | Ca-K | Ti-K |
|-------|-------|------|------|-------|-------|
| 1 | 29,63 | 1,93 | 4,98 | 17,10 | 39,37 |
| 2 | 25,73 | -- | 1,02 | 3,85 | 31,46 |
| 3 | 28,15 | -- | -- | 2,99 | 36,89 |

Também foi realizado um ensaio de difração de raios X, com o objetivo de analisar as fases presentes na amostra C. O difratograma para a amostra C sinterizada a 1250°C está indicado na Figura 4.21.

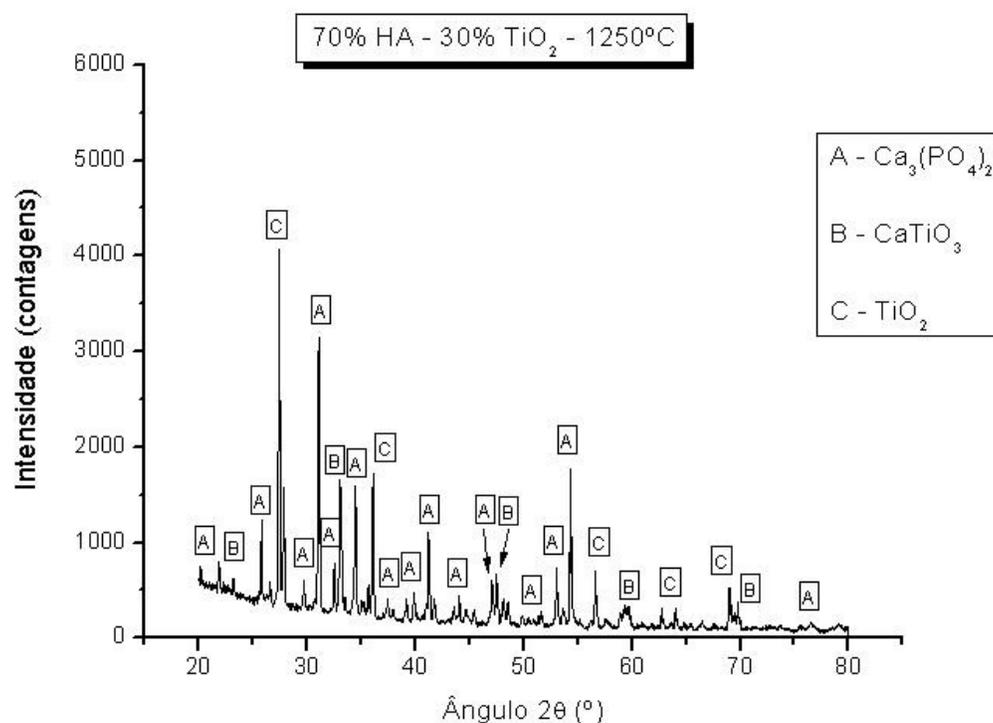


Figura 4.21 – Difratograma de raios X para a amostra C sinterizada a 1250°C.

Observa-se a presença apenas do fosfato de cálcio, do titanato de cálcio e da titânia, embora na composição química da titânia tenha outros óxidos. Também não foi verificada a presença de resíduos da esponja polimérica.

As micrografias dando uma visão geral do compósito poroso e da forma dos poros estão ilustradas na Figura 4.22, após a amostra C ser sinterizada a 1300°C.

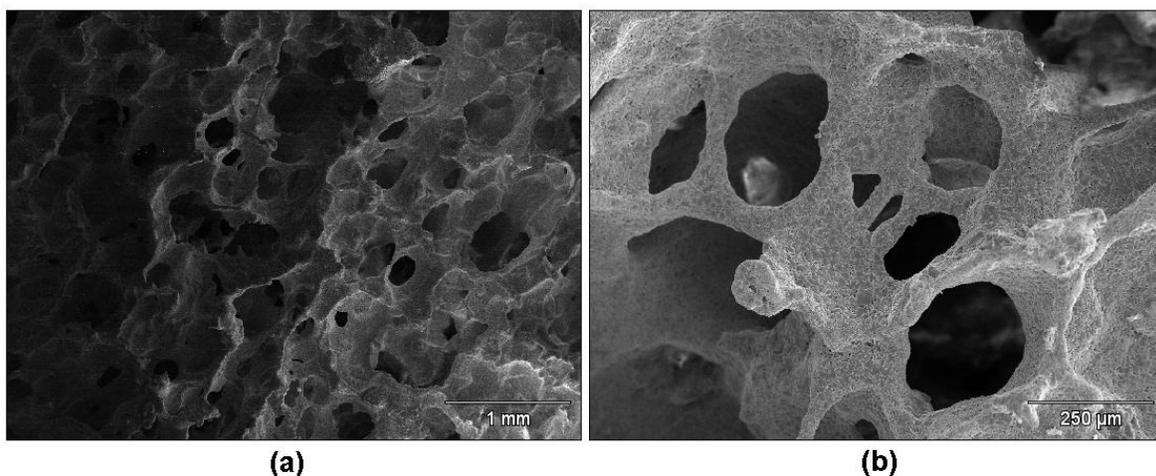


Figura 4.22 – Micrografias da amostra C sinterizada a 1300°C. (a) visão geral; (b) visão dos poros.

Observa-se que o corpo cerâmico reproduziu bem a estrutura da esponja polimérica, onde há uma distribuição regular dos poros, além de ter poros interconectados no formato dos poros da esponja polimérica (Figura 4.22b).

Os resultados do EDS para a amostra C após sinterização a 1300°C estão indicados na Figura 4.23 e na Tabela 4.11. Ainda na Figura 4.23, é possível observar que houve difusão de átomos de partículas menores para partículas maiores, de forma semelhante ao que aconteceu com as partículas da amostra C que foram sinterizados a 1250°C.

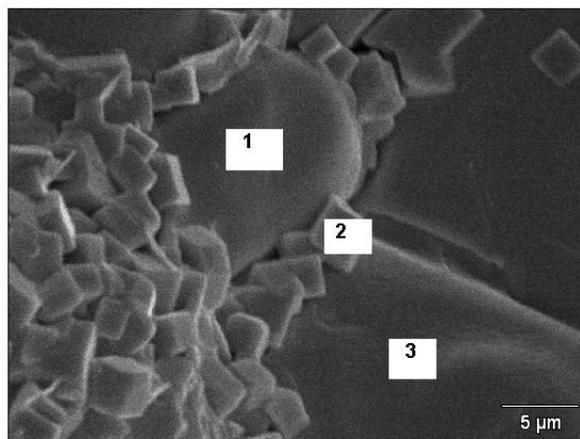


Figura 4.23 - Espectroscopia de raios X por dispersão de energia para a amostra C sinterizada a 1300°C.

Os resultados indicam apenas a presença dos elementos químicos da hidroxiapatita e da titânia, o que serve como indicador que não há presença de resíduos da esponja polimérica.

Tabela 4.11 – Distribuições percentuais em massa dos elementos químicos presentes na amostra C sinterizada a 1300°C.

| Ponto | O-K | Na-K | P-K | Ca-K | Ti-K |
|----------|-------|------|-------|-------|-------|
| 1 | 48,36 | 4,22 | 22,14 | 25,28 | |
| 2 | 54,35 | 1,68 | 5,97 | 19,49 | 18,51 |
| 3 | 39,61 | - | 26,73 | 31,28 | 2,37 |

O difratograma de raios X para a amostra C sinterizada a 1300°C está indicado na Figura 4.24. Nele, observa-se que os picos principais do fosfato de cálcio, do titanato de cálcio e da titânia estão presentes, e que não há presença de outras fases, como por exemplo, possíveis resíduos da esponja polimérica. Também é possível observar que houve variação na intensidade dos picos do fosfato de cálcio, do titanato de cálcio e da titânia.

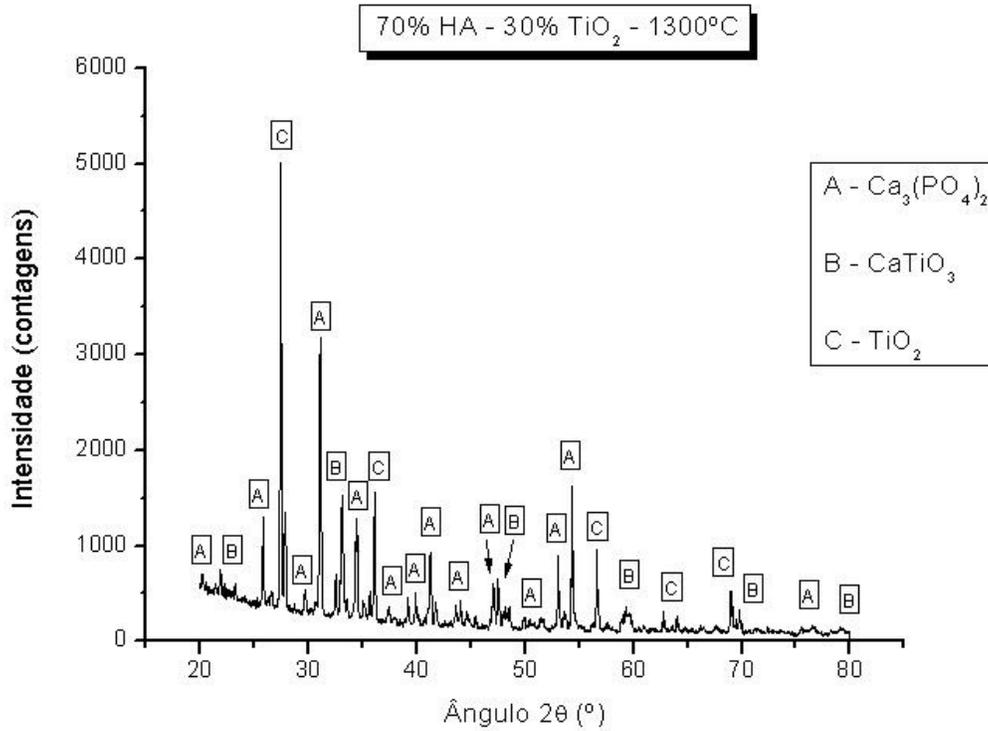


Figura 4.24 – Difratoograma de raios X para a amostra C sinterizada a 1300°C.

A visão geral da amostra sinterizada bem como a forma dos poros da amostra C sinterizada a 1350°C estão indicadas na Figura 4.25.

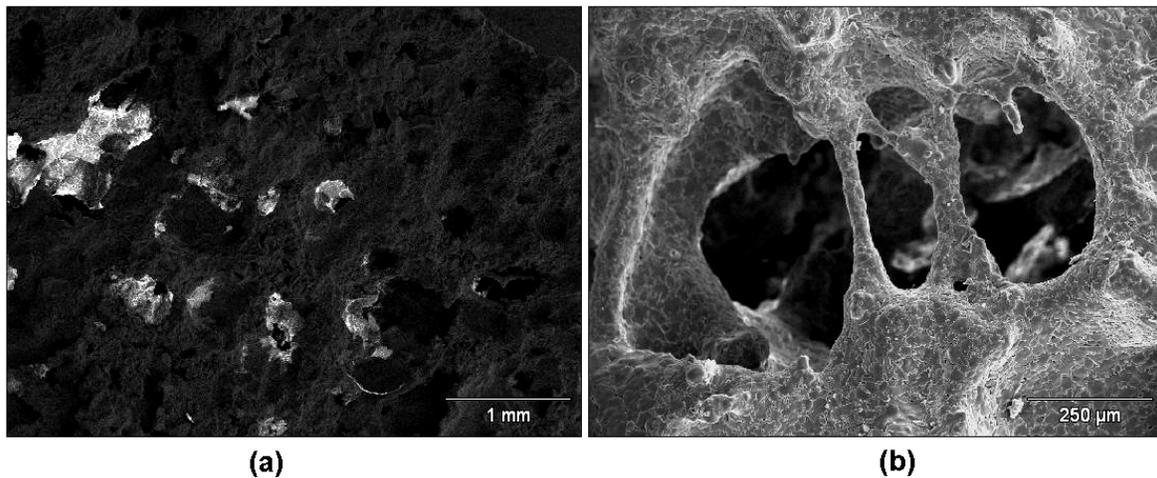


Figura 4.25 – Micrografias da amostra C sinterizada a 1350°C. (a) visão geral; (b) visão dos poros.

Observa-se que o compósito C manteve a integridade física com relação à esponja polimérica, uma vez que este tem poros bem distribuídos e com o formato semelhante aos poros observados na esponja polimérica.

Os resultados de EDS para a amostra C sinterizada a 1350°C estão indicados na Tabela 4.12 e os pontos escolhidos para realizar as análises estão indicados na Figura 4.26. É possível observar na Figura 4.26 que os grãos cresceram quando comparados com os grãos da amostra C sinterizadas a 1250°C e 1300°C, uma vez que houve energia térmica e tempo suficientes para que os átomos das partículas menores difundissem para as partículas maiores.

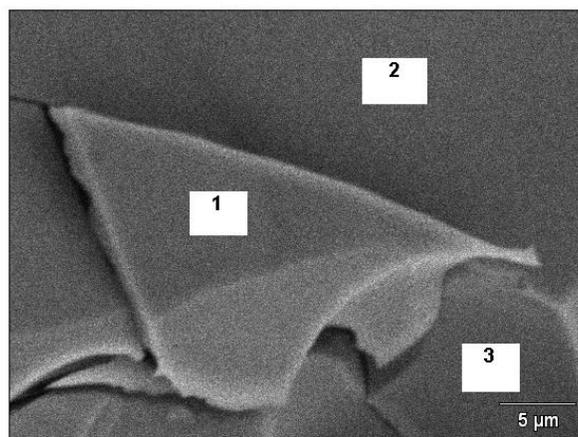


Figura 4.26 - Espectroscopia de raios X por dispersão de energia para a amostra C sinterizada a 1350°C.

Tabela 4.12 – Distribuições percentuais em massa dos elementos químicos presentes na amostra C sinterizada a 1350°C.

| Ponto | O-K | Al-K | P-K | Ca-K | Ti-K |
|-------|-------|------|-------|-------|------|
| 1 | 58,67 | 0,22 | 16,62 | 24,49 | |
| 2 | 25,86 | 0,91 | 23,29 | 48,32 | 1,62 |
| 3 | 58,67 | 0,22 | 16,62 | 24,49 | -- |

É possível perceber quantidades residuais de alumínio, indicativo de óxido de alumínio que está presente na composição da titânia. Fora isso, apenas os elementos

químicos da hidroxiapatita e da titânia estão presentes, o que sugere que não há resíduo da esponja polimérica na amostra.

O difratograma de raios X para a amostra C sinterizada a 1350°C está indicado na Figura 4.27. É possível observar os picos característicos do fosfato de cálcio, do titanato de cálcio e da titânia, com intensidades diferentes das observadas para a mesma amostra sinterizada a 1250°C e 1300°C. Não é observada a presença de resíduos da esponja polimérica, nem traços de outras fases presentes na composição química da titânia.

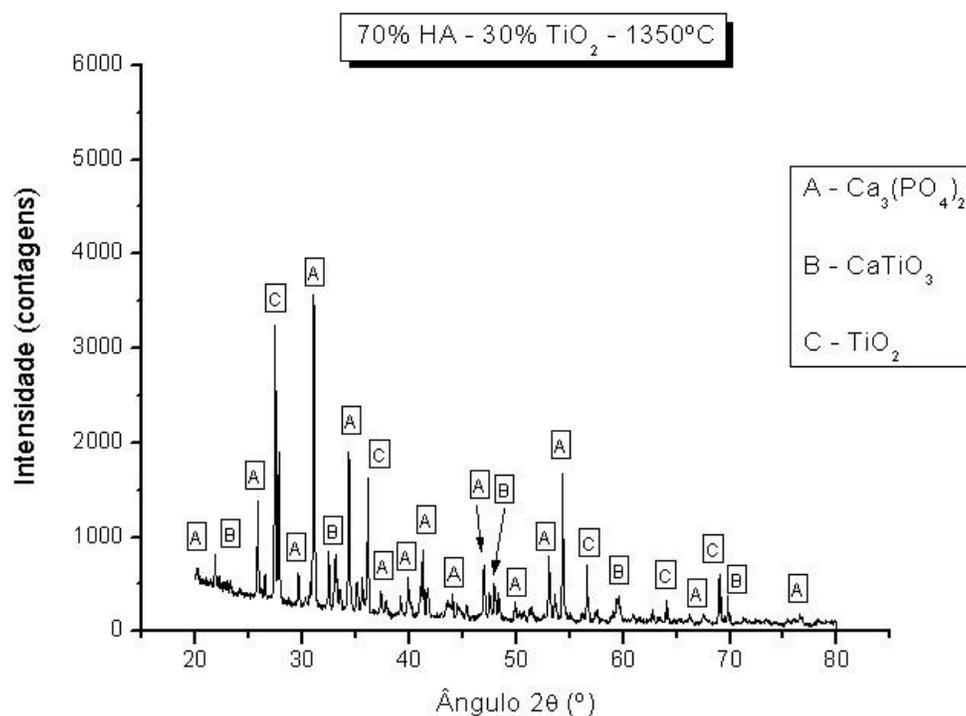


Figura 4.27 – Difratograma de raios X para a amostra C sinterizada a 1350°C.

Também foram realizados refinamentos de Rietveld para todas as composições e temperaturas de sinterização, onde foi utilizado o *software* X'Pert plus, da empresa Panalytical B. V., do grupo Spectris.

Os resultados dos refinamentos de Rietveld encontram-se sumarizados na Tabela 4.13.

Tabela 4.13 – Resultados dos refinamentos de Rietveld para as composições A, B e C a 1250°C, 1300°C e 1350°C.

| Temperatura de sinterização | Fases presentes | Amostras | | |
|-----------------------------|---|----------|------|------|
| | | A | B | C |
| 1250°C | Ca ₃ (PO ₄) ₂ (%) | 47,6 | 56,5 | 64,2 |
| | CaTiO ₃ (%) | 9,4 | 11,4 | 12,0 |
| | TiO ₂ (%) | 43,0 | 32,1 | 23,8 |
| 1300°C | Ca ₃ (PO ₄) ₂ (%) | 58,5 | 59,3 | 65,9 |
| | CaTiO ₃ (%) | 8,7 | 9,0 | 11,5 |
| | TiO ₂ (%) | 32,8 | 31,7 | 22,6 |
| 1350°C | Ca ₃ (PO ₄) ₂ (%) | 53,3 | 66,6 | 76,2 |
| | CaTiO ₃ (%) | 5,4 | 5,5 | 5,2 |
| | TiO ₂ (%) | 41,3 | 27,9 | 18,6 |

Para os ensaios de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier, foram realizadas medidas para todas as temperaturas, porém serão apresentadas apenas as medidas relativas à maior temperatura de sinterização para as três amostras.

As medidas realizadas de FT-IR para a hidroxiapatita pura e titânia estão ilustradas nas Figuras 4.28 e 4.29, respectivamente.

Para a hidroxiapatita, há duas bandas representativas: um de hidroxila (OH) em 3751 cm⁻¹ e outro de íon fosfato (PO₄³⁻) entre 602 e 567 cm⁻¹, enquanto que para a titânia há uma banda de ligações O-Ti-O em 1636 cm⁻¹.

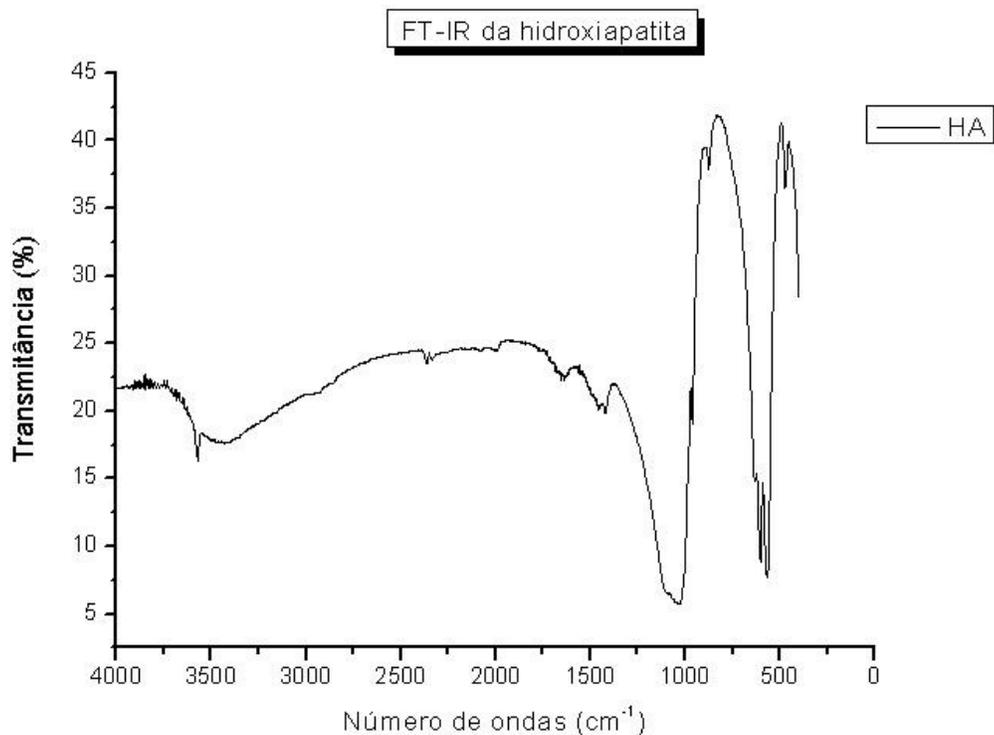


Figura 4.28 – Resultados de FT-IR para a hidroxiapatita pura.

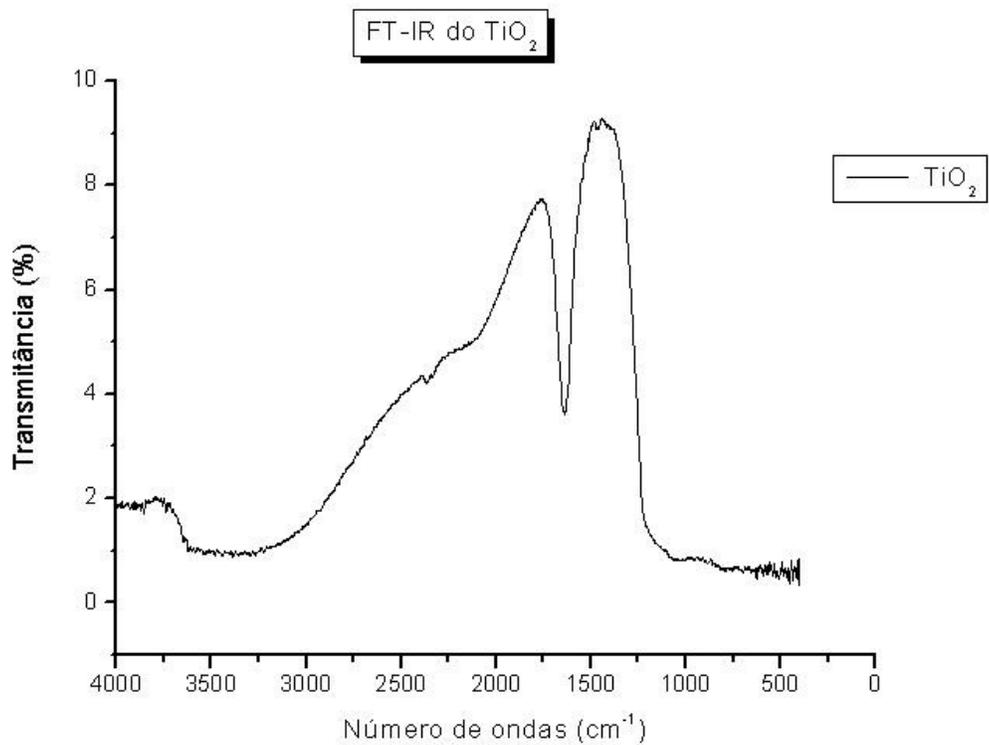


Figura 4.29 - Resultados de FT-IR para a titânia.

Os resultados de FT-IR para as três composições sinterizadas a 1350°C estão indicados na Figura 4.30.

É possível observar a presença da banda de íon fosfato entre 602 e 567 cm^{-1} e do TiO_2 a 1636 cm^{-1} . Como os íons fosfato possuem uma estrutura tetraédrica com o átomo de fósforo no centro, e os átomos de oxigênio na base, à medida que vai aumentando a quantidade de titânia, o espaçamento atômico dessa estrutura vai diminuindo, o que faz com que haja alteração nos picos entre 602 e 567 cm^{-1} . Isso garante uma maior rigidez da estrutura, por conta da maior quantidade de titânia presente. Esse fato também foi observado nas amostras sinterizadas a 1250°C e 1300°C.

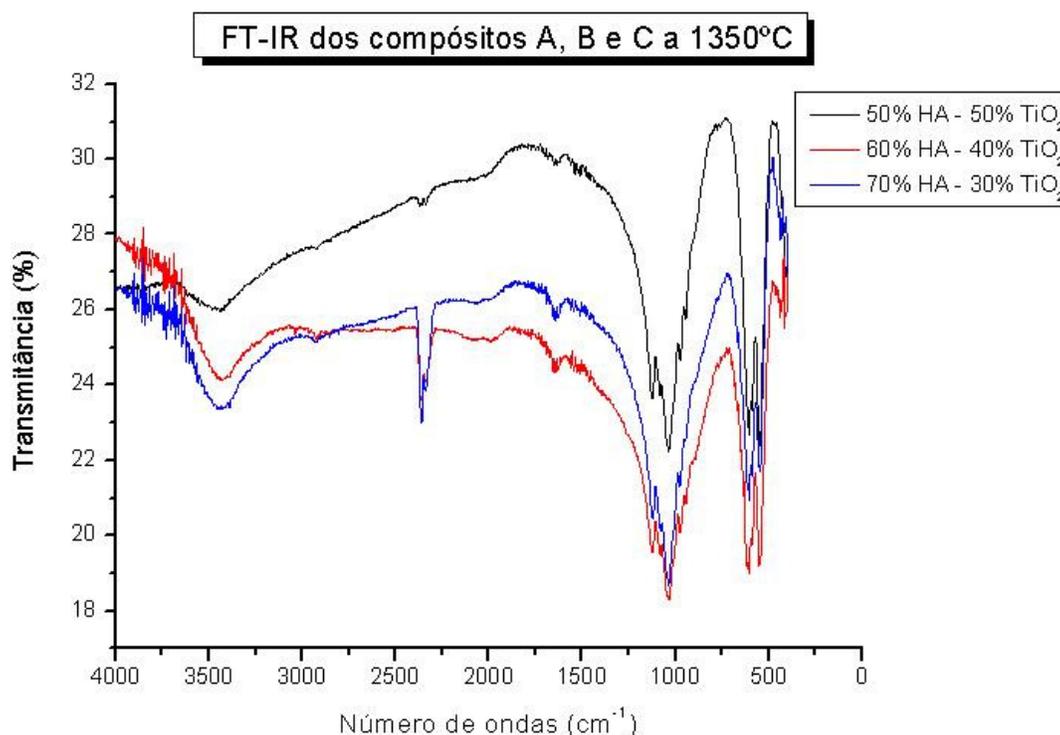


Figura 4.30 – Resultados para as três composições sinterizadas a 1350°C.

- Resultados dos ensaios físicos:

Foram avaliadas as seguintes características cerâmicas para este ensaio: porosidade aparente, absorção de água, densidade aparente e retração linear de queima.

Os resultados obtidos para cada composição estão sumarizados na Tabela 4.14.

Retração linear de sinterização (RQ) – os valores médios variaram de 13,69% (amostra C) a 20,71% (amostra A) a 1250°C; de 15,69% (amostra B) a 26,43% (amostra A) a 1300°C; e de 42,92% (amostra B) a 45,69% (amostra C) a 1350°C, o que indica um comportamento de retração linear semelhante para as três amostras a 1350°C. Observou-se que a hidroxiapatita pura retraiu menos que as três amostras nas condições de temperatura de sinterização. Não foram realizados ensaios para o TiO₂ puro.

Absorção de água (AA) – os valores médios obtidos variaram de 21,77% (amostra C) a 42,96% (amostra A) a 1250°C; de 23,52% (amostra A) a 34,56% (amostra B) a 1300°C; e de 8,29% (amostra B) a 17,81% (amostra A) a 1350°C. Observou-se que a hidroxiapatita pura absorveu mais água que as amostras nas três condições de temperatura.

Tabela 4.14 – Resultados dos ensaios físicos para as amostras A, B e C, após sinterização a 1250°C, 1300°C e 1350°C.

| Temperatura de sinterização | Propriedades físicas | HA | Amostras | | |
|-----------------------------|-------------------------|-------------|------------|------------|-------------|
| | | | A | B | C |
| 1250°C | RQ (%) | 24,72±1,38 | 20,71±5,03 | 17,23±2,96 | 13,69±4,66 |
| | AA (%) | 51,57±18,05 | 33,59±2,30 | 42,96±5,75 | 21,77±4,90 |
| | PA (%) | 53,34±15,39 | 50,69±2,02 | 54,77±3,94 | 46,64±4,76 |
| | DA (g/cm ³) | 1,07±0,14 | 1,51±0,05 | 1,28±0,08 | 1,48±0,10 |
| 1300°C | RQ (%) | 29,91±6,96 | 26,43±8,29 | 15,69±3,59 | 22,62±3,11 |
| | AA (%) | 44,01±7,79 | 23,52±2,52 | 34,56±2,96 | 32,94±5,58 |
| | PA (%) | 51,42±4,79 | 41,37±2,83 | 50,85±2,54 | 49,22±5,48 |
| | DA (g/cm ³) | 1,19±0,13 | 1,77±0,07 | 1,48±0,07 | 1,51±0,10 |
| 1350°C | RQ (%) | 44,67±5,27 | 43,61±5,11 | 42,92±6,40 | 45,69±5,23 |
| | AA (%) | 39,68±3,17 | 17,81±5,51 | 8,29±3,04 | 11,24±5,84 |
| | PA (%) | 48,98±2,41 | 35,68±8,08 | 15,43±5,38 | 22,52±11,63 |
| | DA (g/cm ³) | 1,24±0,05 | 2,04±0,19 | 2,49±0,18 | 2,08±0,23 |

Porosidade aparente (PA) – os valores médios obtidos variaram de 46,64% (amostra C) a 54,77% (amostra B) a 1250°C; de 41,37% (amostra A) a 50,85% (amostra B) a 1300°C; e de 15,43% (amostra B) a 35,68% (amostra A) a 1350°C. Em termos de porosidade aparente, a hidroxiapatita pura não teve muita variação, o que indica que praticamente não há variação de porosidade aparente nas condições de temperatura de sinterização.

Densidade aparente (DA) – os valores médios obtidos variaram de 1,28 g/cm³ (amostra B) a 1,51 g/cm³ (amostra A) a 1250°C; de 1,48 g/cm³ (amostra B) a 1,77 g/cm³ (amostra A) a 1300°C; e de 2,04 g/cm³ (amostra A) a 2,49 g/cm³ (amostra B) a 1350°C. Levando-se em conta que a densidade teórica da hidroxiapatita vale $d_{HA} = 3,156 \text{ g/cm}^3$ e que a da titânia vale $d_{\text{titânia}} = 4,35 \text{ g/cm}^3$, se as amostras fossem densas, deveriam ter densidades iguais a 3,753 g/cm³, 3,634 g/cm³ e 3,514 g/cm³ para as amostras A, B e C, respectivamente. Todas as amostras, independente da temperatura de sinterização, se mostraram menos densas, o que é uma característica de materiais porosos. A hidroxiapatita pura mostrou-se menos densa que os compósitos A, B e C, nas temperaturas de sinterização.

Os resultados obtidos estão de acordo com a literatura, uma vez que com aumento da temperatura, há crescimento de partículas por difusão de átomos de partículas menores para partículas maiores, o que diminui a porosidade aparente. Uma vez que se diminui a porosidade aparente, há maior retração linear de sinterização, maior densificação das amostras (aumento da densidade aparente) e, conseqüentemente, menor absorção de água.

- **Resultados dos ensaios mecânicos:**

Foram avaliadas as seguintes características mecânicas para este ensaio: tensão de ruptura por compressão e microdureza Vickers. Os resultados dessas características encontram-se na Tabela 4.15. Os ensaios de resistência à compressão foram realizados em temperatura de 34°C, com umidade relativa do ar de 53%, enquanto que os ensaios de dureza Vickers foram realizados em temperatura de 22,5°C, com umidade relativa de 60%.

Tabela 4.15 – Resultados do ensaio de compressão e dureza para as amostras A, B e C, sinterizadas a 1250°C, 1300°C e 1350°C.

| Temperatura de sinterização | Propriedades mecânicas | HA | Amostras | | |
|-----------------------------|------------------------|------------|-------------|-------------|-------------|
| | | | A | B | C |
| 1250°C | LRC (MPa) | 2,35±0,76 | 5,54±1,15 | 4,12±2,35 | 3,19±0,79 |
| | HV | 580±87,51 | 709±91,48 | 666±208,20 | 620±131,23 |
| 1300°C | LRC (MPa) | 1,97±1,05 | 5,11±2,12 | 4,65±0,82 | 4,39±1,09 |
| | HV | 654±82,68 | 1084±312,30 | 1064±351,36 | 1017±369,05 |
| 1350°C | LRC (MPa) | 1,58±0,38 | 14,64±1,51 | 9,10±3,07 | 9,05±2,04 |
| | HV | 904±279,06 | 1465±400,91 | 1266±272,01 | 1110±26,29 |

Limite de resistência à compressão (LRC) – Os valores de limite de resistência à compressão da hidroxiapatita variaram de $1,58 \pm 0,38$ MPa (a 1350°C) a $2,35 \pm 0,76$ MPa (a 1250°C). Embora esses valores não sejam tão diferentes quando se utiliza o intervalo de tensões, observou-se que à medida que a temperatura de sinterização aumentou a resistência à compressão da hidroxiapatita pura diminuiu, porém não tão significativamente. Com a adição da titânia à hidroxiapatita, os valores do limite de resistência à compressão aumentaram nas três temperaturas de sinterização, onde o maior valor encontrado foi para a amostra A sinterizada a 1350°C ($14,64 \pm 1,51$ MPa) e o menor valor foi para a amostra C sinterizada a 1250°C. Em todas as condições do trabalho, os valores obtidos para resistência à compressão foram maiores quando houve adição da titânia à hidroxiapatita que os valores dos corpos de prova confeccionados apenas com hidroxiapatita.

Dureza Vickers (HV) – Os valores de dureza Vickers para a hidroxiapatita variaram de $580 \pm 87,51$ HV (a 1250°C) a $904 \pm 279,06$ HV (a 1350°C), o que indica um aumento de dureza da hidroxiapatita à medida que a temperatura de sinterização aumenta. Com a adição de titânia à hidroxiapatita, os valores de dureza sofreram um aumento, onde o maior valor aconteceu para a amostra A sinterizada a 1350°C ($1465 \pm 400,91$ HV) e o menor valor de $620 \pm 131,23$ HV para a amostra C sinterizada a 1250°C. Em todas as condições do

trabalho, houve aumento nos valores da dureza Vickers quando se acrescentou titânia à hidroxiapatita, nas proporções de 30%, 40% e 50% em massa.

Com base nos resultados dos ensaios físicos e mecânicos, foi escolhida a amostra A (50% HA – 50% TiO₂) sinterizada a 1350°C como a composição mais adequada em termos físico-mecânicos para a realização dos ensaios *in vitro*.

4.2. Ensaios *in vitro*:

Linhagens imortalizadas de fibroblastos e osteoblastos foram utilizadas para avaliar o compósito frente a citotoxicidade, crescimento e adesão celular. Nesses ensaios foram utilizados três corpos de prova porosos em um intervalo de cinco dias.

Em células viáveis o reagente MTT, de coloração amarelada, é reduzido a cristais de formazan de cor púrpura, através de enzimas chamadas redutases. A concentração de cristais formados é diretamente proporcional à concentração de células viáveis em um experimento. Uma vez que o compósito testado é rígido e as células estão aderidas ao material (figura 4.31), um passo de solubilização foi acrescido à metodologia. O solvente aprótico DMSO foi utilizado para solubilizar os cristais de formazan formados internamente às células, com isto, houve a formação de uma solução de cor purpura (figura 4.32) e esta foi medida por espectrofotômetro no comprimento de onda de 490 nm. É possível verificar que nos compósitos e soluções dos compósitos controles não se observou coloração alguma enquanto que nos compósitos e soluções dos compósitos que foram colocados em contato com as células durante cinco dias de incubação observou-se uma coloração roxa intensa, demonstrando a presença de células viáveis em contato com o material estudado.

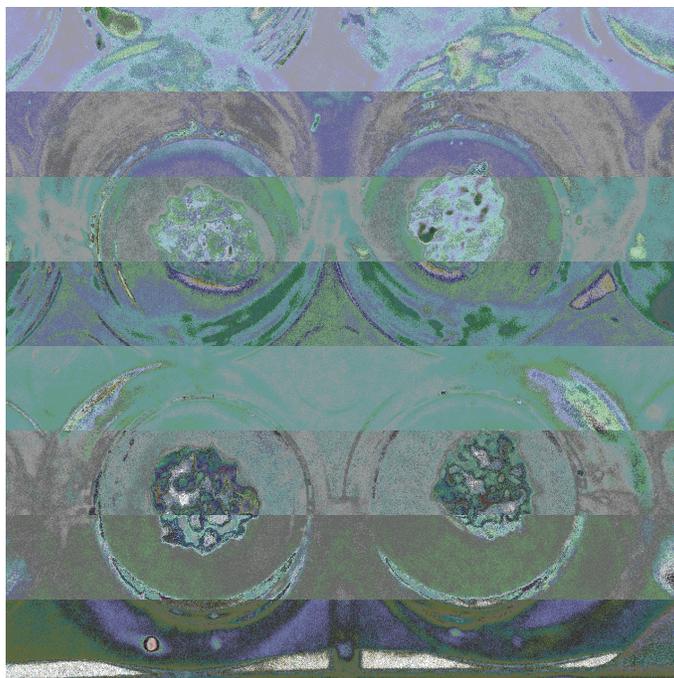


Figura 4.31 - Ensaio de viabilidade celular frente a compósitos cerâmicos pelo método de redução de MTT. Linhagens de fibroblastos (3T3 L1) e osteoblasto (OFCOL II) de camundongos foram incubadas na presença dos compósitos durante cinco dias a 37°C em estufa de CO₂. Os compósitos foram lavados e em seguida o reagente de MTT foi adicionado. Nos poços superiores os compósitos não foram incubados com células (controle negativo) e nos poços inferiores as células foram adicionadas. Nos poços inferiores os pontos escuros referem-se aos grupos de células aderidas ao compósito.

O MTT é um reagente que mede enzimas ativas capazes de reduzir este reagente a um reagente roxo. A presença de células no compósito A também pode ser observada na Figura 4.32, onde a coloração roxa indica a reação das células com o reagente utilizado. A coloração roxa é diretamente proporcional à quantidade de células viáveis no ensaio, ou seja, quanto maior a intensidade do roxo, mais quantidade de células viáveis.

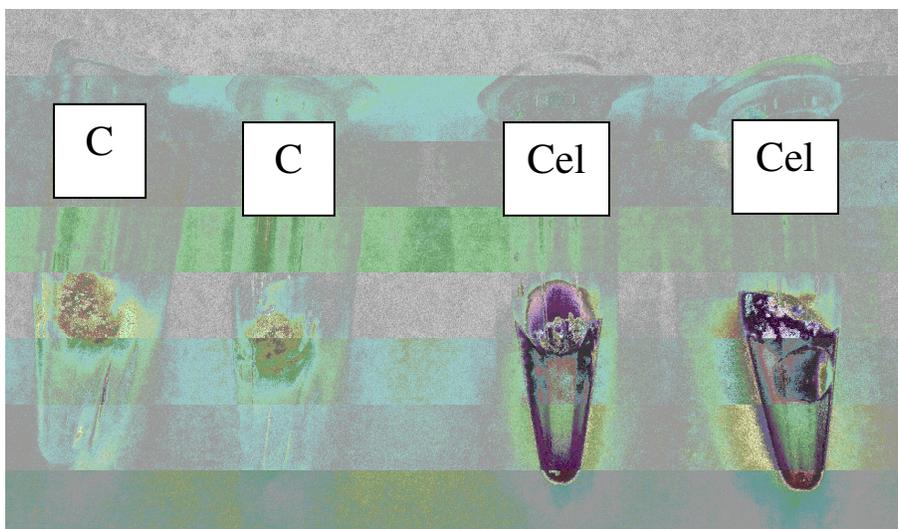


Figura 4.32 – Solubilização dos cristais de formazan por DMSO. O solvente DMSO foi adicionado aos compósitos testados para a dissolução dos cristais de formazan formados internamente às células. Nos compósitos controle não foi observado a alteração de coloração da solução, devido a ausência de células viáveis. Já nos compósitos testes, verificou-se uma intensa coloração roxa, demonstrando a presença de células viáveis aderidas ao material.

Uma vez que as células crescem aderidas no material sem perder a sua viabilidade, curvas de crescimento foram realizadas durante cinco dias. Observa-se, nas Figuras 4.33 e 4.34, que as duas linhagens celulares aderiram ao suporte desde o primeiro dia de ensaio e as células cresceram linearmente durante os cinco dias de avaliação. Nota-se esta linearidade pelos valores de R^2 encontrados pela regressão linear onde os fibroblastos apresentaram R^2 de 0,98952 e os osteoblastos apresentaram R^2 de 0,97612.

Os valores de absorvância em 490 nm foram expressos em média \pm erro padrão ($n = 3$). Percebe-se um crescimento linear em função do tempo evidenciado pela regressão linear $R^2 = 0,98952$ para os fibroblastos assim como para os osteoblastos, cuja regressão linear $R^2 = 0,97612$.

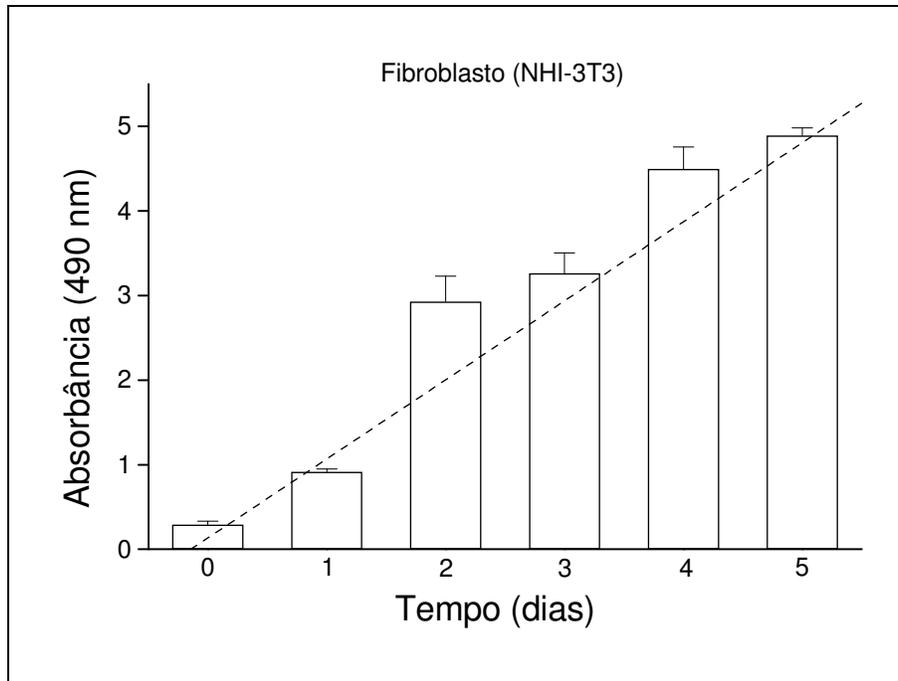


Figura 4.33 – Ensaio de proliferação da linhagem de fibroblastos NIH-3T3 de camundongos no compósito A sinterizado a 1350°C. As células foram incubadas a 37°C em estufa de CO₂ na presença dos compósitos e a cada intervalo de tempo de 24 horas, um compósito foi retirado o método de redução de MTT e a dissolução dos cristais de formazan foi realizada. A solução final de coloração roxa foi medida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 490 nm. O resultado da curva mostrou-se linear com uma regressão de $R^2 = 0,98952$. Os resultados foram expressos pela média e desvio padrão de três ensaios distintos.

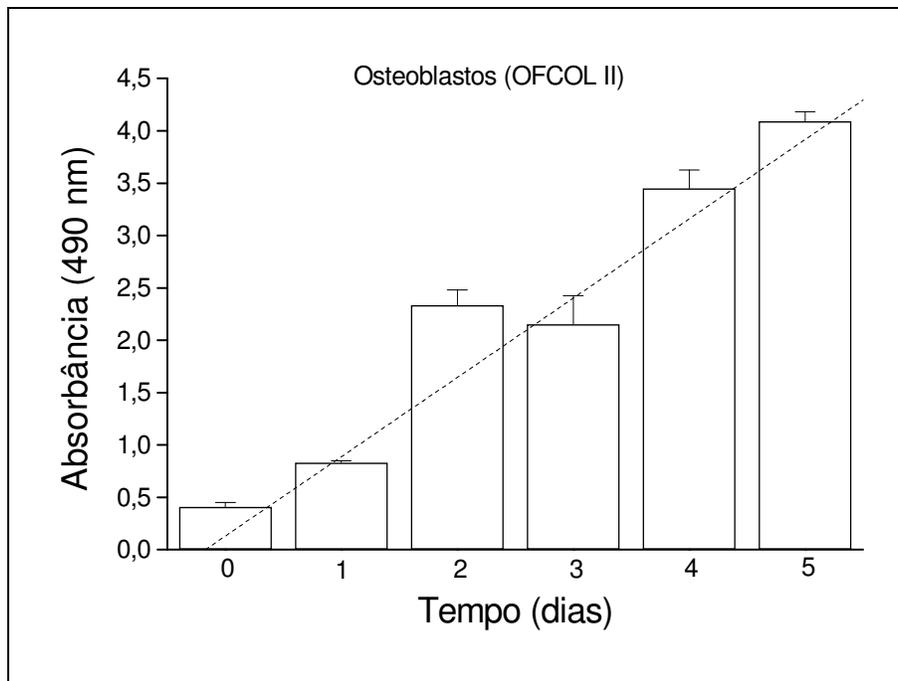


Figura 4.34 – Proliferação de osteoblastos OFCOL II no compósito A sinterizado a 1350°C. As células foram incubadas à 37°C em estufa de CO₂ na presença dos compósitos e a cada intervalo de tempo de 24 horas, um compósito foi retirado o método de redução de MTT e a dissolução dos cristais de formazan foram realizados. A solução final de coloração roxa foi medida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 490 nm. O resultado da curva mostrou-se linear com uma regressão de $R^2 = 0,97612$. Os resultados foram expressos pela média e desvio padrão de três ensaios distintos.

Quando comparamos a proliferação dos fibroblastos com a dos osteoblastos, verifica-se que os fibroblastos apresentaram melhor adaptação ao meio, devido ao seu maior crescimento (figura 4.35).

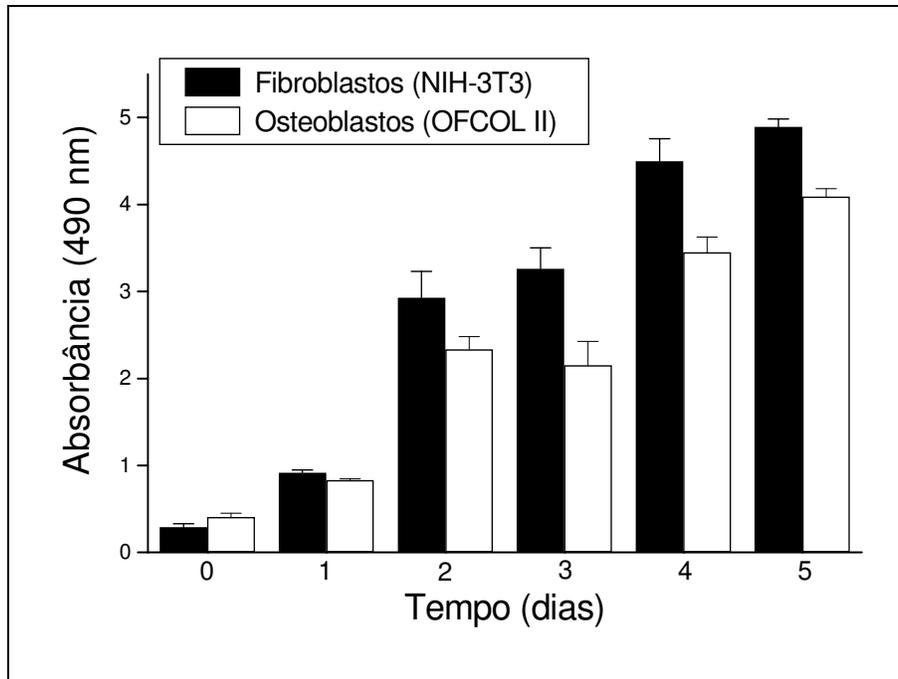


Figura 4.35 – Comparação da proliferação de fibroblastos NIH-3T3 e osteoblastos OFCOL II no compósito A sinterizado a 1350°C. As células foram incubadas à 37°C em estufa de CO₂ na presença dos compósitos e a cada intervalo de tempo de 24 horas, um compósito foi retirado o método de redução de MTT e a dissolução dos cristais de formazan foram realizados. A solução final de coloração roxa foi medida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 490 nm. Nota-se uma maior absorbância nos fibroblastos em comparação aos osteoblastos. Os resultados foram expressos pela média e desvio padrão de três ensaios distintos.

Os compósitos foram ainda avaliados por microscopia de varredura, para verificar se realmente houve a adesão e crescimento das células e qual o local do compósito estas células cresceram mais.

Os fibroblastos são células constituintes do tecido conjuntivo e cuja função é formar uma substância fundamental amorfa (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Cada fibroblasto possui um citoplasma ramificado e rodeado de um núcleo elíptico contendo 1-2 nucléolos. Os fibroblastos ativos podem ser reconhecidos pela abundante ocorrência de retículo endoplasmático. Amadurece, transformando-se em um fibrócito. É responsável pela biossíntese de colágeno do tipo 1. Produz substância intercelular e origina células de outros tecidos conjuntivos, são responsáveis pela regeneração. Os fibroblastos sintetizam as

proteínas colágeno e elastina, além das glicosaminoglicanas e glicoproteínas multiadesivas que farão parte da matriz extracelular. Essas células estão também envolvidas na produção de fatores de crescimento, que controlam o crescimento e a diferenciação celular. Os fibroblastos são as células mais comuns do tecido conjuntivo e são capazes de modular sua capacidade metabólica, a qual vai refletir em sua morfologia. As células com intensa atividade de síntese são denominadas de fibroblastos, enquanto as células metabolicamente quiescentes são conhecidas como fibrócitos.

Como os fibroblastos são células de regeneração, estes tem uma tendência a crescimento rápido, e isto foi bem caracterizado no gráfico da Figura 4.35, e pode ser observado que tais células cresceram inicialmente sobre a superfície do compósito A (Figuras 4.36 c e d), para depois crescer sobre os poros. Como o ensaio durou cinco dias, acredita-se que tais células tendem a fechar os poros rapidamente, porém é preciso realizar ensaios mais longos para avaliar o tempo em que isso ocorre. Como o objetivo deste trabalho era avaliar se as células iriam aderir e crescer à estrutura porosa da amostra A, este ensaio não foi realizado.

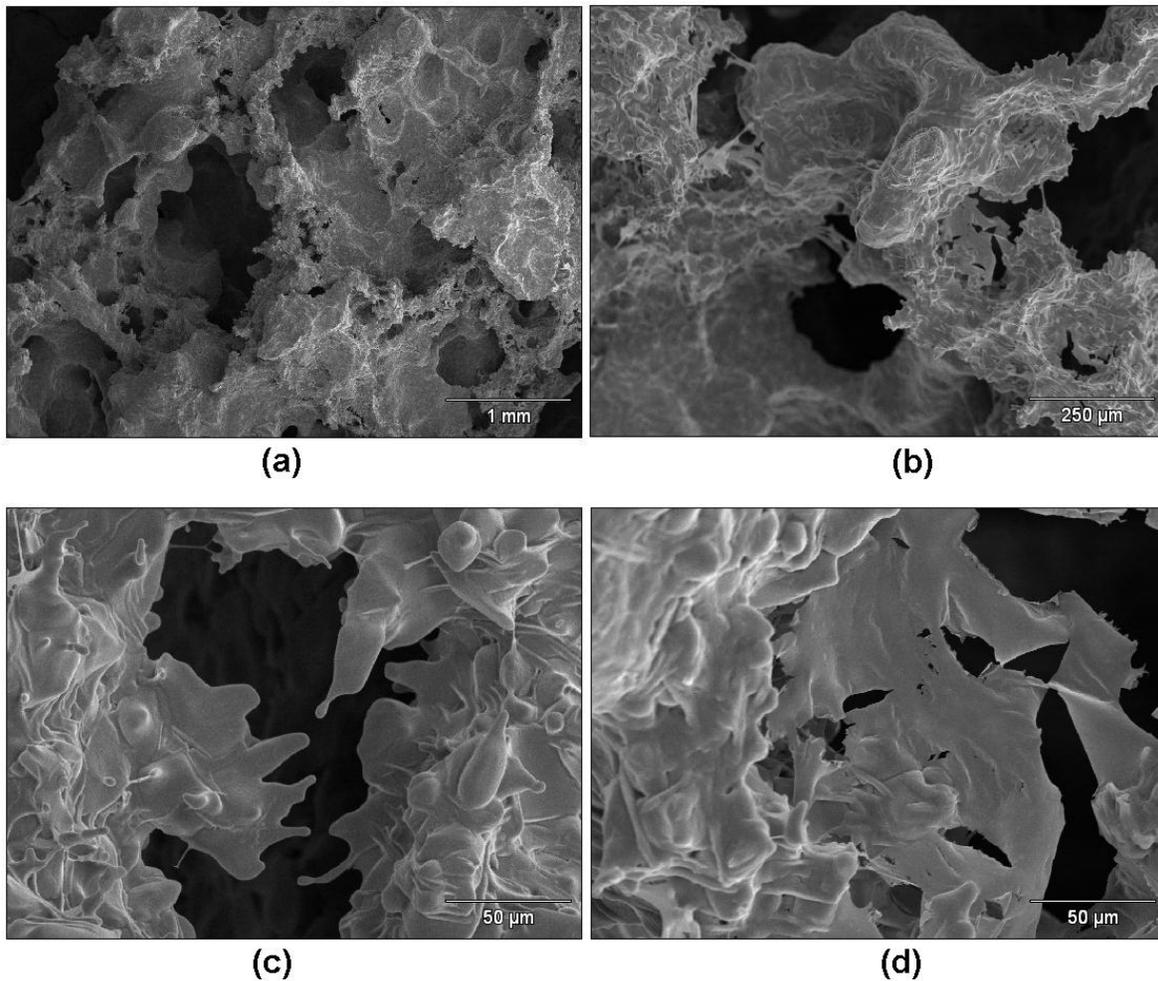


Figura 4.36 – Micrografia eletrônica de varredura indicando o crescimento das células NIH-3T3. (a) visão geral do compósito poroso; (b) visão do formato e tamanho dos poros do compósito poroso; (c) e (d) células NIH-3T3 crescendo nos poros após cinco dias de incubação.

Os osteoblastos são as células provenientes das células osteoprogenitoras, sendo responsáveis pela síntese dos componentes orgânicos da matriz óssea, a saber: colágeno, proteoglicanos, glicoproteínas. Os Osteoblastos localizam-se na superfície do osso, formando lâminas de células cubóides a colunares (GARTNER, 2003).

Quando estão em intensa atividade sintética, suas formas modificam-se, lembrando um cubo, com citoplasma tornando-se mais basófilo. Em estado pouco ativo tornam-se achatados e a basofilia citoplasmática diminui. Uma vez aprisionado pela matriz óssea recém sintetizada, o osteoblasto recebe o nome de osteócito. A matriz deposita-se em redor

da célula e dos seus prolongamentos, formando assim as lacunas e os canalículos (Canais de Havers). Quando os osteoblastos entram em estado de quiescência, deixam de produzir a matriz, se tornam em células de revestimento ósseo.

Assim como aconteceu com os fibroblastos, os osteoblastos também aderiram à estrutura da amostra A e também houve crescimento, porém com uma tendência de velocidade menor (intensidade de absorvância menor para os osteoblastos quando comparados com os fibroblastos, observado na Figura 4.35) quando comparados aos fibroblastos. Este crescimento sobre a estrutura da amostra A pode ser observado nas Figuras 4.37b, c e d, com alguns pontos de crescimento sobre os poros da amostra A. Também é possível observar que os osteoblastos tem uma tendência a crescimento em um tempo bem maior que o dos fibroblastos, uma vez que estes não são células de regeneração, e sim células ósseas. Assim como para os fibroblastos, também não foi realizado um ensaio para ver em quanto tempo tais células irão crescer e fechar totalmente os poros da estrutura porosa da amostra A.

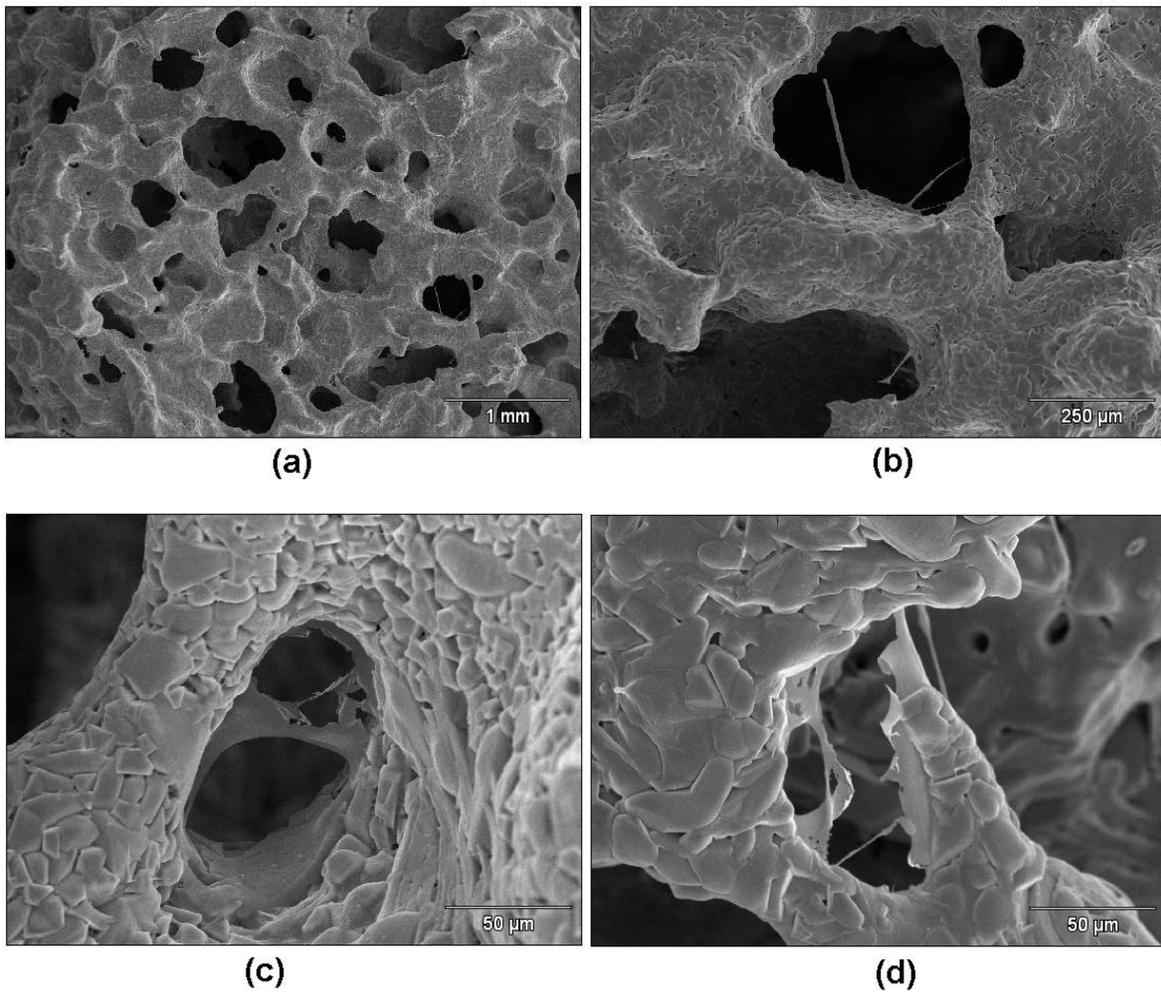


Figura 4.37 – Micrografia eletrônica de varredura indicando o crescimento das células OFCOL II. (a) visão geral do composto poroso; (b) visão do formato e tamanho dos poros do composto poroso; (c) e (d) células OFCOL II crescendo nos poros após cinco dias de incubação.

5 CONCLUSÕES

Foram avaliados o comportamento físico-mecânico e microestrutural de compósitos porosos de hidroxiapatita-titânia com três composições diferentes, com o objetivo de escolher a melhor composição para aplicação em reconstrução óssea. Após a escolha da melhor composição, realizou-se um ensaio *in vitro* para analisar a biocompatibilidade do compósito, via aderência e crescimento celular de células regenerativas (fibroblastos) e ósseas (osteoblastos) de camundongos.

As amostras foram confeccionadas pelo método da esponja polimérica e submetidas ao método sugerido por Souza Santos para avaliar as características físicas de porosidade aparente, densidade aparente, retração linear de queima e absorção de água além do ensaio de resistência à compressão, onde foi utilizada uma norma ASTM. Para o ensaio de dureza Vickers, confeccionaram-se corpos porosos via compressão uniaxial, com valores de porosidade semelhantes aos encontrados no ensaio de porosidade aparente das amostras confeccionadas pelo método da esponja polimérica. O ensaio de dureza Vickers também foi realizado segundo norma da ASTM.

A caracterização estrutural das amostras porosas foi realizada através de microscopia eletrônica de varredura, Espectroscopia de raios X por dispersão de energia e difração de raios X. Chegou-se, então, às seguintes conclusões:

a) Conclusões para os ensaios de caracterização microestrutural dos compósitos porosos A, B e C:

- Em termos estruturais, as três amostras apresentaram boa reprodutibilidade da estrutura física da esponja polimérica após sinterização a 1250°C, 1300°C e 1350°C;
- As amostras A, B e C sinterizadas a 1350°C apresentaram melhor sinterização quando comparadas com as mesmas amostras sinterizadas nas demais temperaturas, uma vez que há pouca ou nenhuma presença de grãos pequenos presentes na

microestrutura final observadas nas micrografias do ensaio de Espectroscopia de raios X por dispersão de energia;

- Não houve presença de resíduos da esponja polimérica nas três composições após sinterização em três temperaturas diferentes;
- Não houve presença do grupo carbonato, porém houve presença do titanato de cálcio e de fosfato de cálcio nas três amostras sinterizadas nas temperaturas do trabalho;
- Conseguiu-se sinterizar em diferentes temperaturas o compósito de hidroxiapatita-titânia pelo método da esponja polimérica, determinando a dinâmica de crescimento de grãos e formação da estrutura do compósito.

b) Conclusões para os ensaios físico-mecânicos dos compósitos porosos A, B e C:

- As amostras A, B e C sinterizadas a 1350°C foram as que apresentaram resultados com valores superiores de resistência mecânica à compressão e dureza Vickers aos da hidroxiapatita pura, onde a amostra A foi a que apresentou maiores valores dessas propriedades mecânicas;
- As amostras A, B e C sinterizadas a 1350°C apresentaram maior retração linear de queima, uma vez que, nessa temperatura, houve maior difusão de átomos de partículas menores para partículas maiores, ocorrendo maior densificação (maior densidade aparente das amostras A, B e C a 1350°C), menor porosidade aparente, acarretando, assim, em menor absorção de água. Dentre as composições estudadas, a amostra A apresentou valores levemente superiores aos das outras amostras e aos da hidroxiapatita.

Com estas conclusões, definiu-se que a melhor condição para os ensaios *in vitro* foi a da amostra A sinterizada a 1350°C, mesmo com redução do tamanho e quantidade de poros, além do aumento da densidade aparente.

c) Conclusões para os ensaios *in vitro* do compósito A:

Após os ensaios *in vitro*, pode-se concluir que:

- As células de fibroblastos e osteoblastos de camundongos aderiram ao compósito;
- As células acima citadas cresceram ao longo do compósito, o que indica que além de biocompatível, o compósito é atóxico para as células.

d) Conclusões gerais:

De forma geral, pode-se concluir que:

- Todas as amostras são indicadas para a utilização como matéria prima para aplicação em engenharia tecidual óssea;
- A amostra A, com composição de 50%HA – 50%TiO₂ apresentou melhores características para a realização dos ensaios *in vitro* realizados neste trabalho;
- Pode-se indicar a amostra A para a realização de ensaios *in vivo*, onde devem ser avaliadas as características de citotoxicidade e crescimento de células ósseas em animais, por um período de 15 e 30 dias, conforme normas da área de saúde.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Como sugestão para futuros trabalhos, recomenda-se:

- Avaliar as condições da amostra A via ensaios *in vivo*, para ver em quanto tempo as células regenerativas e ósseas crescem;
- Estudar formas de otimização do processo da esponja polimérica para obtenção das geometrias necessárias aos ensaios *in vivo*, uma vez que os ensaios *in vivo* não foram realizados pela dificuldade de obtenção da geometria necessária para este tipo de ensaio;
- Avaliar o tempo de crescimento de células ósseas e regenerativas sobre a amostra A, de forma a prever a quantidade do compósito que foi fagocitada durante a aderência e crescimento de células, nos ensaios *in vitro*;
- Avaliar o tempo de crescimento das células, de forma a preencher totalmente o compósito A, tanto na parte densa, quanto na parte porosa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACIDUMAN, A; BELEN, D., **The Earliest Document Regarding the History of Cranioplasty from the Ottomam Era**. *Surgical Neurology*, v. 68, 2007, p. 349 – 353.

AHSAN, T.; NEREM, R.M. **Bioengineered tissues: the science, the technology, and the industry**. *Orthod. Craniofacial Res.*, v. 8, 2005, p. 134 – 140.

ANDERSON, J. M., GRISTINA A. G., HANSON S. R., **Host reactions to biomaterials and their evaluation**, In: Ratner B. D., Hoffman A. S., Schoen F. J. e Lemons J. E. *Biomaterials science; an introduction to materials in medicine*, Volume 1. San Diego: Academic Press, 1996, p. 165 – 214.

ANDERSON, D. G., BURDICK, J. A., LANGER, R. S., **Smart Biomaterials**. *Science*, v. 305, n. 5692, 2004, p. 1923 – 1924.

ASTM C1327, **Standard Test Method for Vickers Indentation Hardness of Advanced Ceramics**, 1999, 8p.

ASTM C1424, **Standard Test Method for Monotonic Compressive Strength of Advanced Ceramics at Ambient Temperature**, 1999, 13p.

ASTM F813, **Standard Practice for Direct Contact Cell Culture Evaluation of Materials for Medical Devices**, 2007, 4p.

ASTM F895, **Standard Test Method for Agar Diffusion Cell Culture Screening for Cytotoxicity**, 1984 (2006), 5p.

BARBANTI, S. H., **Polímeros Bioreabsorvíveis como Suportes na Engenharia de Tecidos**, 2005, 157 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

BAGWELL, R. B., MESSING, G. L., **Critical Factors in the Production of Sol-Gel Derived Porous Alumina**, Key Engineering Materials, Vol. 115, Switzerland, 1996, p. 45.

BARSOUM, M., **Fundamentals of Ceramics**, New York: McGraw – Hill, Inc., 1997, 603 p.

BAYLEY, P. J., **Sponge implants as models**, Methods in Enzymology, n. 162, 1988, p. 327 – 334.

BLOM, A. **Which scaffold for which application?** Curr. Orthop., v. 21, 2007, p. 280 – 287.

BRAUN, J. H., A BAIDINS, R. E. MARGANSKI, **Progress in organic coating**, 20, 1992, p.105.

BRUMATI, P. A., **Utilização de Ceras Naturais no Processo de Moldagem de Cerâmicas por Injeção**, 1995, Dissertação (Mestrado) – Departamento de Engenharia de Materiais, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

BURG, K.J.L.; PORTER, S.; KELLAM, J.F. **Biomaterial developments for bone tissue engineering**. Biomaterials, v. 21, 2000, p. 2347 – 2359.

CARSON, J. S., BOSTROM, M. P. G., **Sinthetic bone scaffolds and fracture repair**, Injury, v. 38, n. 1, 2007, p. S33 – S37.

CARTER, C. BARRY, NORTON, M. GRANT., **Ceramic Materials: Science and Engineering**, New York: Spring Business Media, LLC, 2007.

CHIANG, Y. M., BIRNIE III, D., KINGERY, W. D., **Physical Ceramics – Principles for Ceramic Science and Engineering**, New York: Jon Wiley and Sons, 1997, 544p.

COELHO, M. B., SOAREZ, I. R., PEREIRA, M. M., Estruturas macroporosas de vidro bioativo para cultura de células do tecido ósseo. In: 15º CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS MATERIAIS, **Anais do 15º Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais**, Natal, RN, 2002.

FERNANDES, J. J., SILVA, C. P., GUERRA ROSA, L., Estatística de Weibull Aplicada à Resistência Mecânica de Materiais Cerâmicos, In: 4º ENCONTRO DA SOCIEDADE PORTUGUESA DE MATERIAIS, **Anais do Congresso “Materiais 89” – 4º Encontro da Sociedade Portuguesa de Materiais**, 1989, p. 55 – 66.

FLINN, B. D., BORDIA, R. K., ZIMMERMANN, A., RÖDEL, J., **Evolution of Defect Size and Strength of Porous Alumina During Sintering**, Journal of The European Ceramic Society 20, 2000, p. 2561 – 2568.

GARTNER, L. P., **Tratado de histologia**, 2ª edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2003, 472 p.

GÓES, A. M., LOPES, M. T. P., MAIA, R. M. M. T., SALAS, C. E., **Testes *in vitro* com biomateriais e citotecnia**. In: Biomateriais: fundamentos e aplicações. Rio de Janeiro: Editora Cultura Médica, 2006, Cap. 11, p. 283 – 298.

GOMIDE, V. S., **Desenvolvimento e caracterização mecânica de compósitos hidroxiapatita-zircônia, hidroxiapatita-alumina e hidroxiapatita-titânia para fins biomédicos**, 2005, 121p, Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

HAN, Y, LI, J., WEI, Q., TANG, K., **The Effect of Sintering on Alumina Foam Strength**, Ceramics International, **28**, 2002, p. 755 – 759.

HARDY, D., GREEN, D. J., **Mechanical Properties of a Partially Sintered Alumina**, Journal of the European Ceramic Society, 15, 1995, p. 769 – 775.

HENCH, L. L., **Biomaterials: a forecast for the future**. Biomaterials, v. 19, 1998, p. 1419 – 1423.

HENCH, L. L., WILSON, J., **Introduction to bioceramics**, Singapore: Word Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 1993, p. 1 – 15.

HENCH, L. L., POLAK, J. M., XYNOS, I. D., BUTTERY, L. D., **Biomactive materials to control cell cycle**, Mat. Res. Innovat, v. 3, 2000, p. 313 – 323.

HENCH, L. L., PEREIRA, M. M., ORÉFICE, R. L., JONES, J. R., **Biocompatibilidade, bioatividade e Engenharia de Tecidos**, In: Biomateriais: Fundamentos e Aplicações. Rio de Janeiro: Editora Cultura Médica, 2006, Cap. 16, p. 481 – 506.

HENCH, L. L., POLAK, J. M., **Third generation biomedical materials**, Science, v. 295, 2002, p. 1014 – 1017.

HIRSCHFELD, D. A., LI, T. K., LIU, D. M., **Processing of Porous Oxide Ceramics**, Key Engineering Materials Vol. 115, 1996, p. 65 – 80.

JOHNSON, C. A., TUCKER, W. T., **Advanced Statistical Concepts of Fracture in Brittle Materials**, Engineered Material Handbook, The Materials Information Society, Vol. 4, 1991, p. 709 – 715.

JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO, J., **Histologia Básica**, 11^a edição, Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2008, 528 p.

KAIGLER, D.; MOONEY, D. **Tissue engineering's impact on dentistry.** J. Dent. Educ., v. 65, n. 5, 2001, p.456 – 462.

KELLOMAKI, M. TORMALA, P. **Processing of resorbable poly-alpha-hydroxy acids for use as tissue engineering scaffolds,** Methods in Molecular Biology, v. 238, 2004, p. 1 – 10.

KIMINAMI, R. H. G. A., **Curso de Especialização em Engenharia de Materiais – Processamento de Materiais Cerâmicos,** Apostila da Universidade Federal de São Carlos, 1994.

KIRCHNER, P. H., **Strengthening of Ceramics: Treatments, Tests and Design Applications,** Marcel Dekker, Inc., 1979, 256p.

LANGER, R., **Tissue Engineering,** Molecular Therapy, v. 1, 2000, p. 12.

LANZA, R. P., LANGER, R., VACANTI, J., **Principles of Tissue Engineering – 2nd Edition,** London: Academic Press, 2000, 995p.

LEE, C. K., CHIANG, A. S. T., TSAY, C. S., **The Characterization of Porous Solids from Gas Adsorption Measurements,** Key Engineering Materials, Vol. 115, Switzerland, 1996, p. 21 – 43.

LEMOIS, A. F., FERREIRA, J. M. F., **Porous Bioactive Calcium Carbonate Implants Processed by Starch Consolidation,** Materials Science and Engineering C, 11, 2000, p. 35 – 40.

LIU, T. V., BHATIA, S. N., **Three-dimensional tissue fabrication.** *Advanced Drug Delivery Review*, v.56, 2004, p. 1635 – 1647.

LIU, X.; MA, P.X. **Polymeric Scaffolds for Bone Tissue Engineering**. Ann. Biomed. Eng., v. 32, n. 3, 2004, p. 477 – 486.

MARINS, L. V.; CESTARI, T. M.; SOTTOVIA, A. D.; GRANJEIRO, J. M; TAGA, R. **Radiographic and histological study of perennial bone defect repair in rat calvaria after treatment with blocks of porous bovine organic graft material**. Journal of Applied Oral Science, v. 12, n. 1, 2004, p. 62 – 69.

MAY, T., HAUSER, H., WIRTH, D., **In vitro expansion of tissue cells by conditional proliferation**, In: Hauser, H., Fussenegger, M., Tissue Engineering, second edition., Totowa: Humana Press Inc, 2007. p. 1 – 15.

MIRTCHI, A., LEMAITRE, J., MUNTING, E., **Calcium phosphate cements: action of setting regulators on the properties of α - tricalcium phosphate – monocalcium phosphate cements**, Biomaterials, v. 10, 1989, p. 634 – 638.

NAVARRO, M. MICHIARDI, A., CASTANO, O., PLANELL, J. A., **Biomaterials in orthopaedics**, J. R. Soc. Interface, v. 5, 2008, p. 1137 – 1158.

NOGUEIRA, R. E. F. Q., **Processing and Properties of Moulded Alumina Bodies**, 1992, Thesis (Doctorate of Philosophy) – Department of Materials Technology, Brunel University, England.

PARK, J. B., LAKES, R. S. **Biomaterials: an introduction**, New York: Plenum, 1992, 412p.

PARK, C. K., Characterization of fiber reinforced macro – defect – free cementitious materials, **Journal of the Ceramic Society of Japan**, v. 106 (3), 1998, p. 268 – 271.

PENG, H. X., FAN, Z., EVANS, J. R. G., BUSFIELD, J. J. C., **Microstructure of Ceramics Foams**, Journal of the European Society 20, 2000, p. 807 – 813.

PENG, H. X., FAN, Z., EVANS, J. R. G., **Factors Affecting the Microstructure of a Fine Ceramic Foam**, *Ceramics International* 26, 2000, p. 887 – 895.

PRADO DA SILVA, M. H., LEMOS, A. F., FERREIRA, J. M. F., LOPES, M. A., SANTOS, J. D., **Production of Porous Biomaterials Based on Glass Reinforced Hydroxyapatite Composites**, *Key Engineering Materials*, 230, 2002a, p. 483.

PRADO DA SILVA, M. H., LEMOS, A. F., GIBSON, I. R., FERREIRA, J. M. F., SANTOS, J. D., **Porous Glass Reinforced Hydroxyapatite Materials Produced with Different Organic Additives**, *Journal of Non – Crystalline Solids*, 304, 2002b, p. 286 – 292.

RAMAKRISHNA, S., HUANG, Z. M., KUMAR, G. V., BATCHELOR, A. W., MAYER, J., **An Introduction to Biocomposites, Vol. 1**, London: Imperial College Press, 2004, 223p.

RATNER, B. D., HOFFMAN, A. S., SCHOEN, F. J., LEMONS, J. E., **Biomaterials science: an introduction to materials in medicine**, London: Academic Press, 1996, 864p.

RAVAGLIOLI, A., KRAJEWSKI, A., **Bioceramics: materials, properties, applications**, New York: Chapman and Hall, 1992, 444p.

REED, J. S., **Introduction to the Principles of Ceramic Processing**, New York: John Wiley and Sons, Inc., 1986, 506p.

RICE, R. W., **Porosity of Ceramics**, New York: Marcel Dekker, Inc., 1998, 560p.

RICE, R. W., **The Porosity Dependence of Physical Properties of Materials: A Summary Review**, *Key Engineering Materials*, Vol. 115, Switzerland, 1996, p. 1 – 20.

SACHLOS, E.; CZERNUSZKA, J.T. **Making tissue engineering scaffolds work. Review on the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds.** Eur. Cell Mater., v.5, 2003, p.29 – 40.

SAGGIO-WOYANSKY, J., SCOTT, C. E., **Processing of Porous Ceramics**, American Ceramic Society Bulletin **71**, 11, 1992, p. 1674 – 1682.

SANTOS, L. A., **Desenvolvimento de cimento de fosfato de cálcio reforçado por fibras para uso na área médico-odontológica**, 2002, Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

SASTRE, R., de AZA, S., SAN ROMÁN, J., **Biomateriales**, Florencia: Faenza Editrice Iberica S.L., 2004, 522p.

SHACKELFORD, J. F., **Advanced Ceramics Vol.1: Bioceramics**, Amsterdam: Gordon and Breach Science Publishers, 2005, 82p.

SCHEFFLER, M., COLOMBO, P., **Cellular Ceramics**, Weinheim: Wiley-Vch Verlag GmbH & Co., 2005, 670p.

SHIELDS, J. E., **Ceramics and Glasses**, Engineered Material Handbook, The Materials Information Society, Vol. 4, 1991, p. 580 – 584.

SOARES, G. A., **Biomateriais**, Rio de Janeiro: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, Ciência, Tecnologia e Inovação, 2005, p. 1 – 84.

SOLOMÃO, Z., **Desenvolvimento e Caracterização de Compósitos de Poli(ϵ -Caprolactona) (PCL) e β -Fostato Tricálcico (β -TCP) para Uso em Biomateriais**, 2011, Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

SOUZA SANTOS, P., **Tecnologia de Argilas – Vol. 1**, São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda., 1989, 408p.

TABATA, Y. **Biomaterial technology for tissue engineering applications**. J. R. Soc. Interface, v. 6, 2009, p. S311 – 324.

TAYLOR, E.D.; KHAN, Y.; LAURENCIN, C.T. **Tissue Engineering of Bone: A Primer for the Practicing Hand Surgeon**. J. Hand Surg. Am., v. 34, n. 1, 2009, p. 164 – 166.

US Pharmacopeia, Biological reactivity tests in vitro. US Pharmacopeia 23. Rockville: United State Pharmacopeial Convention Inc. pp. 1697 – 1699, 1995.

VALERIO, P., PEREIRA, M. P., GÓES, A. M., LEITE, M. F., **The effect of ionic products from bioactive glass dissolution on osteoblast proliferation and collagen production**. Biomaterials, v. 25, 2004, p. 2941 – 2948.

VAN VLACK, L. H., **Propriedades dos Materiais Cerâmicos**, São Paulo: Editora Edgard Blucher S.A., 1973, 318p.

VUNJAK-NOVAKOVIC, G.; KAPLAN, D.L. **Tissue Engineering: The Next Generation**. Tissue Eng., v. 12, n. 12, 2006, p. 3261 – 3263.

WILLIAMS, D. F., Definitions in biomaterials, **Progress in Biomedical Engineering**, v. 4, 1987.

WISE, D. L., **Biomaterials and Bioengineering Handbook**, New York: CRC Press, 2000, 936p.

ZHU, X., JIANG, D., TAN, S., **Preparation of Silicon Carbide Reticulated Porous Ceramics**, Materials Science and Engineering A23, 2002, p. 232 – 238.

YANG, J. F., DENG, Z. Y., OHJI, T. **Fabrication and characterization of porous silicon nitride ceramics using Yb_2O_3 as sintering additive**, Journal of the European Ceramic Society 23, 2003, p. 371 – 378.

ZAVAGLIA, C. A. C.; **O uso de biocerâmicas em próteses ortopédicas**. Tese de livre docência, Universidade Estadual de Campinas, 1993.